

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



(19) Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) Publication number:

0 433 900 A1

(12)

## EUROPEAN PATENT APPLICATION

(21) Application number: 90124133.1

(51) Int. Cl.5: C12N 15/12, C07K 13/00,  
C12N 15/79

(22) Date of filing: 13.12.90

(30) Priority: 13.12.89 IL 92697  
12.07.90 IL 95064

(71) Applicant: YEDA RESEARCH AND  
DEVELOPMENT COMPANY LIMITED  
P.O. Box 95  
Rehovot 76100(IL)

(43) Date of publication of application:  
26.06.91 Bulletin 91/26

(72) Inventor: Wallach, David  
24, Borochov Street  
Rehovot 76100(IL)  
Inventor: Nophar, Yaron  
56, Bialic Street  
Ramat Gan, 52441(IL)  
Inventor: Kemper, Oliver  
Anemonenweg 10  
W-6719 Bockenheim(DE)  
Inventor: Engelmann, Hartmut  
Joseph-Lutz-Weg 35  
W-8000 München 70(DE)  
Inventor: Brakebusch, Cord  
Salzbahlumer Weg 9  
W-3300 Braunschweig(DE)  
Inventor: Aderka, Dan  
4, Avivim Street  
Holon(IL)

(84) Designated Contracting States:  
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(74) Representative: Vossius & Partner  
Siebertstrasse 4 P.O. Box 86 07 67  
W-8000 München 86(DE)

(54) Expression of the recombinant tumor necrosis factor binding protein I (TBP-I).

EP 0 433 900 A1

(57) Tumor Necrosis Factor Binding Protein I (TBP-I), precursors and analogs thereof, are produced by transfecting eukaryotic cells with an expression vector comprising a DNA molecule encoding the whole human type I TNF receptor or a soluble domain thereof, and culturing the transfected cells, whereby the soluble proteins are secreted into the medium.

## EXPRESSION OF THE RECOMBINANT TUMOR NECROSIS FACTOR BINDING PROTEIN I (TBP-I)

The present invention relates to human Tumor Necrosis Factor (TNF) Binding Protein I, herein designated TBP-I, and more particularly, to the cloning of the gene coding for said protein and its expression in host cells.

5 TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  (lymphotoxin) are structurally related polypeptide cytokines, produced primarily by mononuclear leukocytes, whose effects on cell function constitute a major factor in the elicitation of the inflammatory response. The TNFs affect cells in different ways, some of which resemble the functional modes of other inflammatory mediators, like interleukin-1 (IL-1) and interleukin-6 (IL-6). What appears most distinctive regarding the activity of the TNFs is that many of their effects can result in cell and tissue destruction. Increasing evidence that over-induction of these destructive activities contributes to the 10 pathogenesis of a number of diseases, makes it of particular interest to elucidate their mechanisms and the ways they are regulated (Old, L.J. (1988) *Sci.Am.* 258, pp. 41-49).

15 High affinity receptors, to which both TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  bind (Beutler, B.A., et al. (1985) *J.Exp.Med.* 161, pp. 984-995) play a key role in the initiation and in the control of the cellular response to these cytokines. These receptors are expressed on the surfaces of a variety of different cells. Studies showing that antibodies reacting with their extracellular portions affect cells in a manner very similar to the TNFs, demonstrate that the receptors and cellular components associated with them are sufficient to provide the 20 intracellular signalling for the effects of the TNFs (Espevik, T., et al., (1990) *J.Exp.Med.* 171, pp. 415-426).

25 Other studies have shown that molecules related to the TNF receptors (TNF-Rs) exist also in soluble forms. Two immunologically distinct species of such soluble TNF-Rs, designated TNF Binding Proteins I and II, or TBP-I and TBP-II, respectively, were recently isolated from human urine (Engelmann, H., et al., (1989) *J.Biol.Chem.* 264, pp. 11974-11980; Engelmann, H., et al., (1990) *J.Biol.Chem.* 265, pp. 1531-1536; Olsson, I., et al., (1989) *Eur.J.Haematol.* 42, pp. 270-275; Seckinger, P., et al., (1989a) *J.Biol.Chem.* 264, pp. 11966-11973). Immunological evidence indicated that the two proteins are structurally related to two molecular species of the cell surface TNF-R (the type I and type II receptors, respectively). Antibodies to each of the two soluble proteins were shown to block specifically the binding of TNF to one of the two 30 receptors and could be used to immunoprecipitate the receptors. Antibodies against one of the two soluble proteins (TBP-I) were also found to induce effects characteristic of TNF in cells which express the immunologically cross-reactive cell receptors (Engelmann, H., et al., (1990) *ibid.*). Like the cell surface receptors for TNF, the soluble forms of these receptors specifically bind TNF and can thus interfere with its binding to cells. It was suggested that they function as physiological inhibitors of TNF activity (Engelmann et al., 1989 (*ibid.*); Olsson et al., 1989 (*ibid.*); Seckinger et al., 1989a (*ibid.*)).

35 Soluble forms of cell surface receptors may be derived from the cell surface form of the receptor by proteolytic cleavage, or by a different mechanism proposed in two recent studies describing the cloning of the cDNAs for the receptors to IL-4 and IL-7. Besides cDNA clones encoding the full length receptors, clones which encode truncated, soluble forms of these receptors were also isolated in these studies. It was suggested that these latter clones are derived from transcripts specifically encoding soluble forms of the 40 receptors, transcribed from the same genes which encode the cell surface forms, but differently spliced (Mosley, B., et al., (1989) *Cell* 59, pp. 335-348; Goodwin, R.G., et al., (1990) *Cell* 60, pp. 941-951).

Two recent studies have described the molecular cloning and expression of human type I TNF cell 45 surface receptor (Loetscher, H., et al. (1990) *Cell* 61, pp. 351-359; Schall, T.J., et al., (1990) *Cell* 61, pp. 361-370).

The present invention relates to the production of human TBP-I, precursors and analogs thereof, by a method comprising transfection of eukaryotic, preferably CHO cells, with an expression vector comprising a DNA molecule encoding the whole type I human TNF receptor or a soluble domain thereof. When the whole 45 DNA molecule is used, soluble proteins are produced by the transfected cells, along with the cell surface receptor, and are secreted into the medium.

The invention further relates to soluble proteins selected from precursors and analogs of TBP-I, which are secreted into the medium by eukaryotic cells transfected with a DNA molecule encoding the whole human type I TNF receptor or a soluble domain thereof.

50 Figure 1 shows the nucleotide sequence of the type I TNF receptor cDNA and the predicted amino acid sequence of the encoded protein.

(A) shows the probes used for screening for the cDNA, wherein:

(a) shows the NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of TBP-I;

(b) shows synthetic oligonucleotide probes, designed on the basis of the NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence, used for initial screening; and

(c) and (d) are probes overlapping with (b), used to confirm the validity of clones isolated in the initial screening.

5 (B) is the schematic presentation of the cDNA clones isolated from a human colon (C2) and from CEM-lymphocytes (E13) libraries and a diagram of the complete cDNA structure. Untranslated sequences are represented by a line. Coding regions are boxed. The shaded portions represent the sequences which encode the signal peptide and the transmembrane domains.

10 (C) shows the hydropathy profile of the predicted amino acid sequence of the TNF receptor. Hydropathicity (above the line) and hydrophilicity (below the line) values were determined using the sequence analysis software package of the University of Wisconsin genetic computer group (UWCG) according to Kyte and Doolittle (1982). The curve is the average of the hydrophobicity index for each residue over a window of nine residues.

15 (D) depicts the nucleotide and predicted amino acid sequences of the type I TNF receptor. The presumptive start and stop signals are denoted by asterisks; the three sequences derived from TBP-I by broken overlining; the transmembrane and leader domains by round-ended boxes; and the four repetitive sequences in the extracellular domain by thick underlining. Cysteine residues are boxed. Glycosylation sites are overlined and the presumptive polyadenylation signal is underlined.

20 Figure 2 shows the detection of type I TNF-R using monoclonal antibodies to TBP-I in CHO cells transfected with E13 cDNA. CHO cells, clones R-18 (transfected with an expression vector in which the E13 cDNA was placed under the control of an SV40 promoter) and C-6 (control; a clone of cells transfected with an expression vector in which E13 was placed in the inverse orientation), and HeLa cells, were stained with the anti-TBP-I monoclonal antibodies 17, 18, 20 and 30 followed by incubation with FITC conjugated anti-mouse F(ab). Fluorescence intensity was compared with that observed when a mouse monoclonal antibody against TNF was used in the first step of the staining as a control.

25 Figure 3 shows reversed phase HPLC of the CHO-produced, soluble form of the type I TNF-R. A concentrate of the conditioned medium of the CHO R-18 clones (see Fig. 2) and a concentrate of the CHO C-6 clone to which 3 ng pure TBP-I was added, were applied to an Aquapore RP300 column. Elution was performed with a gradient of acetonitrile in 0.3% aqueous trifluoroacetic acid (—). Fractions were examined for content of protein (—) and of the soluble form of the type I receptor by an ELISA

30

(■),

35 (as described in Example 1: Procedures). None of the eluted fractions of a concentrate of the CHO C-6 clone, without addition of TBP-I, was found to contain any detectable amounts of the soluble form of the receptor (not shown).

Figure 4 shows the time course of the release of COOH-terminal amino acids from TBP-I by carboxypeptidase Y.

40 Figure 5 shows the construction of plasmid pSV-TBP, which contains the DNA sequence encoding TBP-I fused to the strong SV40 early gene promoter.

45 Figure 6 shows the construction of the plasmid pCMV-TBP, which contains the DNA sequence encoding TBP-I fused to the cytomegalovirus (CMV) promoter.

Purified TBP-I isolated from human urine was described in European Patent Application EP 0 308 378 of the present applicants and shown to contain at the N-terminus the amino acid sequence shown in Fig. 1Aa.

The COOH-terminal of TBP-I was determined now and shown to contain a major fraction containing the sequence Ile-Glu-Asn denoted by broken overlining at positions 178-180 in Fig. 1D, and at least one minor fraction including at least two further amino acids Val-Lys at positions 181-182.

50 The invention relates to a method for the production of a soluble recombinant protein selected from human Tumor Necrosis Factor Binding Protein I (TBP-I), biologically active precursors and analogs thereof, which comprises:

- i) transfecting eukaryotic cells with an expression vector comprising a DNA molecule encoding the whole type I human TNF receptor or a soluble domain thereof, and
- ii) culturing the transfected cells, whereby the desired protein is produced and secreted into the medium.

55 The DNA sequence encoding the whole type I TNF receptor is depicted in Figure 1D. The soluble domain thereof includes the sequence down to position 180 (Asn) or 182 (Lys) or even some additional amino acids after position 182.

The soluble proteins produced by the transfected cells according to the method of the invention and

secreted into the medium may have at the N-terminus the sequence Asp-Ser-Val denoted by broken overlining at positions 20-23 in Fig. 1D (TBP-I), or the sequence Leu-Val-Pro at positions 9-11 or Ile-Tyr-Pro at positions 1-3 or any other sequence between Ile(+1) and Asp(20). The proteins may have at the COOH terminal any of the sequences described above. All these soluble proteins, if biologically active with TBP-I like activity, are encompassed by the invention as precursors and analogs of TBP-I.

According to the invention, oligonucleotide probes designed on the basis of the NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of TBP-I, were synthesized by known methods and used for screening for the cDNA coding for TBP-I in cDNA libraries. In a human colon cDNA library, a C2 cDNA insert was found which hybridized to said probes and it was used for further screening in a human CEM-lymphocytes lambda ZAP cDNA library, thus leading to the cDNA shown in Fig. 1D.

The DNAs of positive clones were then inserted into appropriately constructed expression vectors by techniques well known in the art. In order to be capable of expressing a desired protein, an expression vector should comprise also specific nucleotide sequences containing transcriptional and translational regulatory information linked to the DNA coding for the desired protein in such a way as to permit gene expression and production of the protein. The gene must be preceded by a promoter in order to be transcribed. There are a variety of such promoters in use, which work with different efficiencies (strong and weak promoters).

The DNA molecule comprising the nucleotide sequence coding for a protein comprising the amino acid sequence of TBP-I, i.e. TBP-I, a precursor or an analog thereof, preceded by a nucleotide sequence of a signal peptide and the operably linked transcriptional and translational regulatory signals is inserted into a vector which is capable of integrating the desired gene sequences into the host cell chromosome. The cells which have stably integrated the introduced DNA into their chromosomes can be selected by also introducing one or more markers which allow for selection of host cells which contain the expression vector.

In a preferred embodiment, the introduced DNA molecule will be incorporated into a plasmid or viral vector capable of autonomous replication in the recipient host. Factors of importance in selecting a particular plasmid or viral vector include the ease with which recipient cells that contain the vector may be recognized and selected from those recipient cells which do not contain the vector; the number of copies of the vector which are desired in a particular host and whether it is desirable to be able to "shuttle" the vector between host cells of different species. Once the vector or DNA sequence containing the construct(s) has been prepared for expression, the DNA construct(s) may be introduced into an appropriate host cell by any of a variety of suitable means: transformation, transfection, conjugation, protoplast fusion, electroporation, calcium phosphate precipitation, direct microinjection, etc.

Host cells to be used in this invention may be either prokaryotic or eukaryotic. Prokaryotic hosts, such as bacteria, e.g. E.coli, are used only when the cDNA encoding the soluble domain of the type I TNF receptor is used to transfet the cells. Under such conditions, the protein will not be glycosylated. The prokaryotic host must be compatible with the replicon and control sequences in the expression plasmid.

Eukaryotic cells are transfected according to the invention with plasmids comprising the cDNA encoding the whole type I TNF receptor. Preferred eukaryotic hosts are mammalian cells, e.g., human, monkey, mouse and chinese hamster ovary (CHO) cells. They provide the soluble form of the protein, besides the cell surface receptor, and provide post-translational modifications to protein molecules including correct folding or glycosylation at correct sites. The eukaryotic cells may also be transfected with a plasmid comprising a cDNA encoding a soluble domain of the human type I TNF receptor molecule. Preferred mammalian cells according to the invention are CHO cells.

After the introduction of the vector, the host cells are grown in a selective medium, which selects for the growth of vector-containing cells. Expression of the cloned gene sequence(s) results in the production of the desired soluble protein, that is secreted into the medium, and may then be isolated and purified by any conventional procedure involving extraction, precipitation, chromatography, electrophoresis, or the like.

In a preferred embodiment, CHO cells are transfected with the type I TNF-R cDNA shown in Fig. 1D and they produce both the cell surface receptor and TBP-I, its soluble form, and/or precursors and analogs thereof.

The data presented in the present application are consistent with the notion that TBP-I - the soluble form for the type I TNF-R - constitutes a fragment of the cell surface form of this receptor, corresponding to its extracellular domain. The receptor is recognized by several monoclonal antibodies to TBP-I which interact with several spatially distinct epitopes in this protein. The amino acid sequence in the extracellular domain matches the sequence of TBP-I.

Particularly informative with regard to the mechanism of formation of TBP-I is the finding described in the present application, that a soluble form of the type I TNF-R is produced by CHO cells which were transfected with the TNF-R cDNA. This implies that cells possess some mechanism(s) which allow(s) the

formation of the soluble form of the TNF-R from that same transcript that encodes the cell surface form.

The low rate of production of the soluble form of the type I TNF-R by the E13-transfected CHO cells does not necessarily reflect maximal activity. In HT29 cells, the spontaneous release of a soluble form of type I TNF-R occurs at about a 10-fold higher rate than that observed with the CHO-R-18 clone.

5 A likely mechanism whereby soluble forms of TNF receptors can be derived from the same transcripts which encode the cell surface forms is proteolytic cleavage. Indeed, flanking the amino acid residue which corresponds to the NH<sub>2</sub>-terminus of TBP-I there are, within the sequence of amino acids of the receptor, two basic amino acid residues (Lys-Arg) which can serve as a site of cleavage by trypsin-like proteases. The identity of the proteases which might cause cleavage to take place at the COOH terminus of TBP-I is 10 not known.

The invention will be illustrated by the following examples:

EXAMPLE 1: PROCEDURES

15 A) Determination of amino acid sequences within the TNF-binding proteins TBP-I and TBP-II

The TNF Binding Proteins TBP-I and TBP-II were isolated from concentrated preparations of urinary proteins, as described previously (Engelmann, H., et al., (1990) J.Biol.Chem. 265, pp. 1531-1536) by ligand (TNF) affinity chromatography followed by reversed phase HPLC. TBP-I was cleaved with cyanogen bromide, yielding two peptides which, following reduction and alkylation, were isolated by reversed phase HPLC. The two peptides (CNBr-1 and CNBr-2 in Table I) were subjected to NH<sub>2</sub>-terminal sequence analysis or a pulsed liquid gas phase protein microsequencer (Model 475A, Applied Biosystems Inc., Foster City CA). The sequence found for one of the peptides (CNBr-1) was identical to the NH<sub>2</sub> sequence of the intact TBP-I protein.

20 25 The COOH terminal sequence of amino acids in TBP-I was determined by digestion of the protein with carboxypeptidase Y followed by sequential analysis of the released amino acids. A sample of pure TBP-I (32  $\mu$ g) was mixed with 1 nmole of norleucine, as an internal standard, dried thoroughly and resuspended in 8  $\mu$ l 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5, containing 0.8  $\mu$ g carboxypeptidase Y (Sigma, St. Louis, MO). Digestion was performed at room temperature, 2  $\mu$ l Aliquots withdrawn at various time points were acidified 30 by adding 3  $\mu$ l of 10% acetic acid to each, followed by addition of 15  $\mu$ l 0.5% EDTA. They were then subjected to automated amino acid analysis (Applied Biosystems, U.K. model 420A). The results (shown in Fig. 4) indicate the sequence -Ile-Glu-Asn-COOH. Minor fractions were detected containing two or more additional amino acids.

35 Sequences within TBP-II were determined by generation of tryptic peptides of the protein. A sample of pure TBP-II (200  $\mu$ g) was reduced, alkylated and repurified on an Aquapore RP-300 reversed-phase HPLC column. Fractions containing the modified protein were pooled and the pH was adjusted to 8.0 with NaHCO<sub>3</sub>. Digestion with TPCK-trypsin (238 U/mg, Millipore Corp., Freehold, NJ) was performed for 16 h. at 40 room temperature at an enzyme to substrate ratio of 1:20 (w/w). The digest was loaded on a C<sub>18</sub> RP-P reversed phase HPLC column (Synchrom, Linden, IN) and the peptides separated by a linear 0 to 40% acetonitrile gradient in 0.3% aqueous trifluoroacetic acid. The NH<sub>2</sub> terminal amino acid sequences of the peptides and of the intact protein (N-terminus) are presented in Table I. The peptides were numbered according to their sequences of elution from the RP-P column. In the fractions denoted as 39,44,46,53 and 54, where heterogeneity of sequences was observed, both the major and the secondary sequences are presented.

45 b) Isolation of cDNA clones

50 Three mixtures of synthetic oligonucleotide probes (Figs. 1Ab, 1Ac) generated from the nucleotide sequence deduced from the NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of TBP-I (Fig. 1Aa) were used for the screening of cDNA libraries. Initial screenings were carried out with 48-fold degenerated, 26-mers into which deoxyinosine was introduced, wherever the codon ambiguity allowed for all four nucleotides (Fig. 1Ab). The validity of positive clones was examined by testing their hybridization to two mixed 17-mer nucleotide sequences containing 96 and 128 degeneracies, corresponding to two overlapping amino acid sequences which constitute part of the sequences to which the 26-base probes correspond (Fig. 1Ac and d). An 55 oligonucleotide probe corresponding to a sequence located close to the 5' terminus of the longest of the partial cDNA clones isolated with the degenerated probes (nucleotides 478-458 in Fig. 1D) was applied for further screening cDNA libraries for a full length cDNA clone. <sup>32</sup>P-labeling of the probes, using T4 polynucleotide kinase, plating of the phages in lawns of bacteria, their screening with the radio-labelled

probes, isolation of the positive clones and subcloning of their cDNA inserts were carried out using standard procedures (Sambrook, J., et al., (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press).

5 c) Nucleotide sequencing of the cDNA clones

cDNA inserts isolated from positive lambda GT11 recombinant phages were subcloned into the pBluescript KS(-) vector. Inserts found in lambda ZAP phages were rescued by excising the plasmid pBluescript SK(-) in them, using the R408 helper phage (Short, J.M., et al., (1988) Nucl.Acids Res. 16, pp. 10 7583-7600). DNA sequencing in both directions was done by the dideoxy chain termination method. Overlapping deletion clones of the cDNAs were generated, in both orientations, by digestion of the cDNA with exonuclease III ("Erase a base" kit, Promega Biotec, Madison, WI). Single stranded templates derived from these clones using the R408 phage were sequenced with a T7 DNA polymerase sequencing system (Promega).

15 d) Constitutive expression of the type I human TNF-R in CHO cells

The E13 insert was introduced into a modified version of the pSVL expression vector. This construct was transfected, together with the pSV2-DHFR plasmid which contains the DHFR cDNA, into DHFR 20 deficient CHO cells, using the calcium phosphate precipitation method. Transfection with a recombinant pSVL vector which contained the E13 insert in the inverse orientation served as a control. Cells expressing the DHFR gene were selected by growth in nucleotide-free MEM alpha medium containing fetal calf serum which had been dialyzed against phosphate buffered saline. Individual clones were picked out and then further selected for amplification of the transfected cDNAs by growth in the presence of 500 nM sodium 25 methotrexate.

e) Detection of surface-expressed type I TNF-R in the CHO cells

Binding of radiolabelled human rTNF to cells (seeded in 15 mm tissue culture plates at a density of 2.5 30  $\times 10^5$  cells/plate) was quantitated as described before (Holtmann, H. and Wallach, D. (1987) J.Immunol. 139, pp. 1161-1167).

To examine the binding of monoclonal antibodies against TBP-I to CHO cells, the cells were detached by incubation in phosphate buffered saline (PBS: 140 mM NaCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>), containing 5 mM EDTA and then incubated for 45 min. at 0 °C with 35 50 µg/ml of the test monoclonal antibody in PBS containing 0.5% bovine serum albumin, and 15 mM sodium azide (PBS/BSA). After washing the cells with PBS/BSA they were incubated further for 30 min. at 0 °C with FITC labelled, affinity purified goat antibody to the F(ab) fragment of mouse IgG (1:20 in PBS/BSA) (Bio-Makor, Israel) and then analyzed by determining the intensity of fluorescence in samples of 10<sup>4</sup> cells using the Becton Dickinson fluorescence activated cell sorter 440. Three monoclonal antibodies to TBP-I, clones 40 17, 18 and 20, shown by cross competition analysis to recognize four spatially distinct epitopes in the TBP-I molecule (European Patent Application No. 90115105.0) and, as a control, a monoclonal antibody against TNF-α (all purified from ascitic fluids by ammonium sulphate precipitation and of the IgG2 isotype), were used.

45 f) Quantitation of the soluble form of the type I TNF-R by ELISA

A sensitive enzyme linked immunosorbent assay was set up using TBP-I-specific monoclonal and polyclonal antibodies in a sandwich technique. Immunoglobulins of the anti-TBP-I mAb clone 20 (European Patent Application No. 90115105.0) were adsorbed to 96-well ELISA plates (maxisorp, Nunc, Denmark) by 50 incubation of the plates for 2 h. at 37 °C with a solution of 25 µg/ml of the antibody in PBS. After incubating the wells further for 2 h. at 37 °C with a solution containing phosphate buffered saline, 1% BSA, 0.02% NaN<sub>3</sub> and 0.05% Tween 20 (blocking solution) to block nonspecific further binding of protein, tested samples were applied in aliquots of 50 µl/well. The plates were then incubated for 2 h. at 37 °C, rinsed 3 times with PBS supplemented with 0.05% Tween 20 (washing solution) and rabbit polyclonal antiserum 55 against TBP-I, diluted 1:500 in blocking solution, was added to the walls. After further incubation for 12 h. at 4 °C the plates were rinsed again and incubated for 2 h. with horse raddish peroxidase-conjugated purified goat anti-rabbit IgG. The assay was developed using 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6 sulfonic acid) as a substrate (Sigma). The enzymatic product was determined colorimetrically at 600 nm. Pure TBP-I served

as a standard.

g) Detection of a soluble form of the type I TNF-R in the growth medium of the transfected CHO cells and its analysis by reversed phase HPLC

5 The amounts of the soluble form of the type I TNF-R in samples of the medium of the tested CHO cells, collected 48 h after medium replacement, were determined by the immunoassay described above. For analysis of the soluble receptor by reversed phase HPLC the CHO cells were cultured for 48 h. in serum-free medium (nucleotide-free MEM α). The medium samples were concentrated 100-fold by ultrafiltration on an Amicon PM5 membrane and 100 µl aliquots were then applied to an Aquapore RP300 column (4.5 X 30 mm, Brownlee Labs) preequilibrated with 0.3% aqueous trifluoroacetic acid. The column was washed with this solution at a flow rate of 0.5 ml/min until all unbound proteins were removed, and then eluted with a gradient of acetonitrile concentration in 0.3% aqueous trifluoroacetic acid, as described before (Engelmann, H., et al., (1989) *J.Biol.Chem.* **264**, pp. 11974-11980). Fractions of 0.5 ml were collected and, 10 after concentration in vacuo, were neutralized with 1 M HEPES buffer pH 9.0. Amounts of soluble type I TNF-R in the fractions were determined by ELISA and the concentration of protein by the fluorescamine method.

EXAMPLE 2

20 a) Cloning of the cDNA for the Type I TNF-R

To clone the cDNAs which code for the TNF-binding protein, TBP-I, and its related TNF receptor, several cDNA libraries were screened, using 3 overlapping oligonucleotide probes designed on the basis of 25 the NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of TBP-I (Fig. 1A). In a lambda GT11 library derived from the mRNA of human colon (randomly primed, Clontech, Palo Alto, CA), four recombinant phages which hybridized with the three probes were detected. The inserts in these four phages were similar in size, and were found to overlap by restriction mapping and sequence analysis.

Complete analysis of the sequence of the longest of the four (C2 in Fig. 1B, deposited on 6.12.1989 30 with the Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.), Paris, France, Accession No. I-917) revealed an open reading frame, extended over its entire length. A polypeptide chain encoded in this reading frame fully matches the NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of TBP-I. Neither an initiation nor a stop codon was found in the C2 insert. Rescreening the colon cDNA library, using another probe corresponding to a sequence found in C2 (see Example 1: Procedures), yielded several other recombinant phages 35 containing inserts that overlap with the C2 insert. However, none of them provided further sequence information on the cDNA in the 5' or the 3' direction. In a lambda ZAP cDNA library derived from the mRNA of CEM lymphocytes (Oligo dT and randomly primed, Clontech) five phages hybridizing with this probe were detected, which contained significantly longer inserts than C2.

The longest insert (E13, Fig. 1B) was sequenced in its entirety (Fig. 1D) and was found to contain the 40 C2 sequence (nucleotides 346-1277 in Fig. 1D) within one long open reading frame of 1365 bp, flanked by untranslated regions of 255 and 555 nucleotides at its 5' and 3' ends, respectively. The potential ATG initiation site, occurring at positions 256-258 in the nucleotide sequence (denoted by an asterisk in Fig. 1D) is preceded by an upstream in-frame termination codon at bases 244-246. The start location is in conformity with one of the possible alternatives for the translation initiation consensus sequence 45 (GGCATGG, nucleotides 253-259).

There is no characteristic poly(A) addition signal near the 3' end of the cDNA. The sequence ACTAAA, at nucleotides 2045-2050, may serve as an alternative to this signal, but with low efficiency. At nucleotides 1965-2000, there are six consecutive repeats of the sequence G(T)n (n varying between 4 and 8).

The size of the protein encoded by the cDNA (about 50 kD) is significantly larger than that of TBP-I. A 50 hydrophathy index computation of the deduced amino acid sequence of the protein (Fig. 1C) revealed two major hydrophobic regions (see round-ended boxes in Fig. 1D). One, at its NH<sub>2</sub>-terminus, is apparently the signal peptide whose most likely cleavage site lies between the glycine and isoleucine residues designated in Fig. 1D as -1 and +1 respectively. The other major hydrophobic domain, located between residues 191 and 213, is flanked at both ends by several charged amino acids, characteristic of a membrane anchoring 55 domain. As in several other transmembrane proteins, the amino acids confining the hydrophobic domain at its COOH-terminal are basic. The transmembrane domain bisects the predicted protein into almost equally sized extracellular and intracellular domains.

The extracellular domain has 3 putative sites for asparagine-linked glycosylation (overlined in Fig. 1D).

Assuming that the amount of oligosaccharides in the extracellular domain is similar to that reported as present in TBP-I (Seckinger, P., et al., (1989b) *Cytokine* 1, 149 (an abstract)), the molecular size of the mature protein is very similar to that estimated for the type I receptor (about 58kD) (Hohmann, H.P., et al., (1989) *J.Biol.Chem.* 264, pp. 14927-14934).

5 b) Features of the predicted amino acid sequence in the Type I TNF-R and relationship to the structure of TBP-I and TBP-II

The amino acid sequence of the extracellular domain of the protein encoded by the E13 cDNA fully 10 matches several sequences of amino acids determined in TBP-I (Table I). It contains the NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of TBP-I at amino acids 20-32 (compare Fig. 1D and Fig. 1Aa), a sequence corresponding to the COOH terminus of TBP-I at amino acid 178-180; and, also, adjacent to the first methionine located further downstream in the encoded protein, a sequence which is identical to the NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of a cyanogenbromide cleavage fragment of TBP-I (broken lines in Fig. 1D). 15 There is also a marked similarity in amino acid composition between the extracellular domain of the receptor and TBP-I (Table II).

The most salient feature of this amino acid composition is a very high content of cystein residues (shown boxed in Fig. 1D). The positioning of the cystein residues as well as of other amino acids within the 20 extracellular domain displays a four-fold repetition pattern (underlined in Fig. 1D). The amino acid sequence within the extracellular domain of the TNF-R, which corresponds to the COOH terminal sequence of TBP-I (see Table I and Fig. 4), is located at the COOH terminus of the cystein-rich repeat region. The sequence corresponding to the NH<sub>2</sub> terminal sequence of TBP-I corresponds to a sequence located a few amino acids upstream of the NH<sub>2</sub> terminal end of this region (broken lines in Fig. 1D) in the extracellular domain.

In contrast to the identity of amino acid sequences between TBP-I and the extracellular domain of the 25 type I TNF receptor, sequences examined in the soluble form of the type II TNF-R (TBP-II, Table I) were not identical to any sequence in the type I TNF-R. This finding is expected, considering the lack of immunological crossreactivity between the two receptors (Engelmann, H., et al., (1990) *J.Biol.Chem.* 265, pp. 1531-1536).

In contrast to the very high content of cystein residues in the putative extracellular domain of the type I 30 TNF-R, there are only 5 cystein residues in the intracellular domain. Between the two which are proximal to the transmembrane domain (positions 227 and 283), extends a stretch of 55 amino acids which is rich in proline residues (15% of the residues) and even richer in serine and threonine residues (36%), most located very close to or adjacent to each other.

35 EXAMPLE 3

Expression of the type I TNF-R cDNA

To explore the relation between the protein encoded by the E13 cDNA and TBP-I further, this protein 40 was expressed in CHO cells. The E13 cDNA was introduced into an expression vector and was cotransfected with a recombinant vector containing the dihydrofolate reductase (DHFR) cDNA into DHFR-deficient cells. After selection by growth in a nucleotide-free medium, individual clones were amplified by growth in the presence of methotrexate. A number of clones which react with several monoclonal antibodies that bind to spatially distinct epitopes in TBP-I were detected (Fig.2). Expression of the protein was correlated with an 45 increase in specific binding of human TNF to the cells (Table III).

Applying a sensitive immunoassay for TBP-I in which polyclonal antibodies and a monoclonal antibody against this protein were employed, (Procedures, Example 1f) in the medium of CHO cells which express the human TNF-R on their surface, also a soluble form of the protein could be detected (Table III). All of five 50 different CHO clones which expressed the TNF-R, produced this soluble protein. Several other transfected clones which did not express the cell surface receptor did not produce its soluble form either. When analyzed by reversed phase HPLC, the CHO-produced soluble TNF-R eluted as a single peak, with a retention time identical to that of TBP-I (Fig. 3).

EXAMPLE 4

55 Cloning of the cDNA encoding TBP-I and expression of TBP-I in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells

In order to obtain plasmids suitable for efficient expression of the DNA encoding a soluble domain of

the type I TNF receptor in mammalian cells, the gene from position 256 to position 858 of the DNA sequence shown in Fig. 1D, was cloned in two expression vectors: in one plasmid, gene expression was under the SV40 early gene promoter; in the second plasmid, gene expression was under the regulation of the cytomegalovirus (CMV) promoter. These vectors were introduced into CHO cells by CaPO<sub>4</sub> coprecipitation with a plasmid DHFR selectable genetic marker.

#### Construction of Expression Vectors

##### 1) SV40 Early Promoter-TBP-I fusion: Plasmid pSV-TBP.

10 Constitutive expression of TBP-I can be achieved by using an expression vector that contains the DNA sequence coding for TBP-I fused to the strong SV40 early gene promoter (Fig 5).

Step 1: A DNA fragment coding for TBP-I, including its signal peptide and extending to amino acid 180 was prepared by PCR amplification. For amplification two oligonucleotides were used as primers: the 5' end primer contains the sequence coding for the first seven amino acids of the signal peptide, preceded by six nucleotides; the 3' end oligonucleotide contains the sequence coding for amino acid residues 174 through 180 followed by two stop codons (TGA and TAA).

15 The conditions for PCR amplification are the following:

20

	Temperature °C	Time min	
25	1 cycle	94 6 50 2 72 4	
30	30 cycles	94 1 50 2 72 4	
35	1 cycle	94 1 50 2 72 12	

Step 2: After sequence verification, the amplified DNA fragment was cloned into the HincII restriction site of plasmid pGEM-1 by blunt end ligation. Plasmids pTBP-16 and pTBP-17 are the two plasmids obtained in this way and they differ in the orientation of the TBP-I insert with respect to the cloning vector.

Step 3: The DNA fragment containing TBP-I was excised from plasmid pTBP-17 using the two adjacent restriction sites HindIII (at the 5' end) and BamHI (at the 3' end).

45 Step 4: Finally, this fragment was cloned between the HindIII and the BclI restriction sites of the expression vector pSVE3.

The resulting plasmid is called pSV-TBP (Fig. 5).

##### 2) CMV promoter-TBP-I fusion: plasmid pCMV-TBP.

50 Alternatively, constitutive expression of TBP-I can be achieved by using an expression vector that contains the DNA sequence coding for TBP-I fused to the CMV promoter (Fig 6).

The first two steps for the construction of the CMV based vector are identical to the ones described for the construction of the SV40-TBFI fusion plasmid, as described above.

55 Step 3: The DNA fragment containing TBP-I was excised from plasmid pTBP-17 using the two adjacent restriction sites HindIII (at the 5' end) and XbaI (at the 3' end).

Step 4: Finally, this fragment was cloned between the HindIII and the XbaI restriction sites of the expression vector pCMV.

The resulting plasmid is called pCMV-TBP.

Expression of Human TBP-I in CHO Cells

5 CHO cells CHO-K1 DHFR<sup>-</sup>, lacking DHFR activity, were transformed by CaPO<sub>4</sub> coprecipitation with a 12:1 mixture of uncut pSV-TBP DNA (73 µg) and mpSV2DHFR (6 µg) DNA, the latter being the selectable marker. Alternatively, CHO cells were transformed with a 5:1 mixture of pCMV-TBP (30 µg) and mpSV2DHFR (6 µg).

10 Cells were grown in nutrient mixture F12 (Gibco) with 10% fetal calf serum (FCS) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.

15 For DNA transfection, 5x10<sup>5</sup> cells were cultured for one day in 9 cm plates. A CaPO<sub>4</sub>-DNA coprecipitate was prepared by mixing plasmid DNAs, dissolved in 0.45 ml of Tris-HCl pH 7.9, 0.1 mM EDTA with 0.05 ml of 2.5 M CaCl<sub>2</sub>; thereafter, 0.5 ml of 280 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM Hepes buffer pH 7.1 was added with gentle mixing. The mixture was kept for 30-40 minutes at room temperature in order to form the precipitate. After adding the CaPO<sub>4</sub>-DNA to the cells and leaving the cells at room temperature for 30 min, 9 ml of nutrient mixture F12, 10% FCS were added and the cultures returned to the CO<sub>2</sub> incubator for 4 hours. Medium was removed and the cells were osmotically shocked with 10% glycerol in F12 for 4 min. After 48 hours of growth in non-selective medium, the cells were then trypsinized and subcultured 1:10 into selective medium, composed of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (H21, Gibco), 150 µg/ml proline, and 10% FCS which had been extensively dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS). In some cases, 20 MEM alpha medium without nucleotides (F20, Gibco) was used. The cultures were kept at 37 °C and 10% CO<sub>2</sub> and the medium was changed every 3-4 days. Clones were isolated after about 15 days, trypsinized, and grown to mass cultures.

Transformants able to grow in medium lacking thymidine (DMEM with dialyzed serum) were obtained. Culture supernatants of individual transformant clones or culture supernatant of mixed populations were 25 screened for human TBP-I by measuring the level of secreted protein by the enzyme linked immunoassay described in Example 1f. TBP-I levels of up to 10 ng/ml were detected in culture supernatants of mixed cells populations.

This example shown that TBP-I or a similar soluble protein can be obtained also by transfection of mammalian cells with a DNA encoding the soluble domain of the type I TNF receptor.

30

EXAMPLE 5

Expression of TBP-I in E. coli.

35 For expression of TBP-I in E.coli, the sequence coding for the signal peptide and for the first 19 aminoacids (Arg) must be removed (Figure 1D). Moreover, the Asp residue must be preceded by a Met residue. The desired fragment is then cloned into the expression vector pKK223-3 that contains the hybrid tryp-lac promoter. To achieve this goal plasmid pTBP-16 (Fig 5) is cut with the two unique restriction sites StyI and HindIII. StyI restriction site is C/CAAGG and, therefore, it cuts after Pro24. HindIII restriction site is 40 located in the polylinker of the plasmid and downstream from the two added stop codons that follow Asn180 (Fig. 5).

The resulting DNA fragment, coding for TBP-I, has an intact 3' end and a truncated 5' end, where the sequence preceding the StyI site and coding for Asp-Ser-Val-Cys-Pro has been removed.

45 For cloning of the StyI-HindIII fragment into the expression vector pKK223-3, the following couple of synthetic oligonucleotides are used:

Met Asp Ser Val Cys Pro

50	5' AATTC ATG GAT AGT GTG TGT CCC	3'
45	3' G TAC CTA TCA CAC ACA GGG GTT C	5'
[ ] [ ]		
55	EcoRI	StyI

One end of this double stranded oligonucleotide is an EcoRI restriction site. This end is ligated to the EcoRI site of plasmid pKK223-3, located downstream to the tryp-lac promoter. The second end of the double stranded oligonucleotide is a StyI restriction site to be ligated to the StyI of the TBP-I DNA fragment.

5 The remainder of the sequence is such that the codons coding for the first five amino acids are restored and an additional Met codon is added in front of Asp20. The expression vector is obtained by ligation of plasmid pKK223-3, digested with EcoRI and HindIII, to the double-stranded synthetic oligonucleotide and to the StyI-HindIII TBPI fragment.

E.coli cells are transfected with this expression vector in order to produce TBP-I.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Table I: Amino acid sequences of TBP I and TBP II

TBP I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNB-1 (N-terminus)	NH <sub>2</sub>	Asp	Ser	Val	Cys	Pro	Gln	Gly	Lys	Tyr	ILs	His	Pro	Gln	--
CNB-2	NH <sub>2</sub>	Gly	Gln	Val	Glu	ILs	Ser	Ser	Cys	Thr	Vat	Asp	Arg	Thr	Val
C-terminus	--	Ile	Glu	Asn	COOH										
TBP II	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
N-terminus	NH <sub>2</sub>	Gln	Val	Ala	Pro	Leu	Ile	Arg	Lys	Phe	Thr	Pro	Tyr	Ala	Pro
TRP 35	NH <sub>2</sub>	Leu	Cys	Ala	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Arg	9	10	11	12
TRP 391	NH <sub>2</sub>	Cys	Arg	Pro	Gly										
TRP 392	NH <sub>2</sub>	Glu	Tyr	Tyr	Asp	Gln	Thr	Ala	Gln	Met	Cys	Cys	...		
TRP 441	NH <sub>2</sub>	Glu	Tyr	Tyr	Asp	Gln	Thr	Ala	Gln	Met	Cys	Cys	Ser	...	
TRP 442	NH <sub>2</sub>	Ser	Cys	Gly	Pro	Ser	Tyr	Pro	Asp	...					
TRP 451	NH <sub>2</sub>	Phe	Thr	Pro	Tyr	Ala	Pro	Glu	Pro	Gly	Sur	Thr	Cys	Arg	
TRP 462	NH <sub>2</sub>	Leu	Arg	Glu	Tyr	Tyr	Asp	Gln	Thr	Ala	Gln	Met	Cys	Cys	...
TRP 50	NH <sub>2</sub>	Leu	Arg	Glu	Tyr	Tyr	Asp	Gln	Thr	Ala	Gln	Met	Cys	Cys	...
TRP 541	NH <sub>2</sub>	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Ser	Lys					
TRP 542	NH <sub>2</sub>	Ala	Gln	Val	Ala	Phe	Thr	Pro	Tyr	Ala	Pro	Glu	Pro	Gly	Ser
TRP 547	NH <sub>2</sub>	Val	Ala	Phe	Thr	Pro	Tyr	Ala	Pro	Glu	Pro	Gly	Ser	Thr	Cys
TRP 552	NH <sub>2</sub>	Cys	Arg	Pro	Gly										
TRP 60	NH <sub>2</sub>	Ile	Cys	Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Tyr	Cys	Ala	Leu	Ser	...	
TRP 62	NH <sub>2</sub>	Pro	Gly	Thr	Glu	Thr	Ser	Asp	Val	Cys	lys	Pro	Gly	Thr	Pha
TRP 65	NH <sub>2</sub>	Pro	Gly	Thr	Glu	Thr	Ser	Asp	Val	Cys	lys	Pro	Gly	Thr	Ser
TRP 67	NH <sub>2</sub>	Cys	Arg	Pro	Gly	Val	Ala	Arg	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Ser	Asp
TRP 84	NH <sub>2</sub>	Thr	Ser	Asp	Thr	Val	Cys	Asp	Ser	Cys	Glu	Asp	Ser	Thr	Gly

Table II. Similarity of the amino acid compositions of the TNF binding protein TBPI and a corresponding region in the extracellular domain of the TNF-R (type I)

	Amino acid	mol/100 mol of amino acids	
		TBPI*	Residues 20-180 in the extracellular domain**
5	Ala 1.7	1.2	
10	Cys	12.8	14.9
	Asp + Asn	10.9	11.1
	Glu + Gln	13.9	12.4
15	Thr	3.2	3.1
	Gly	8.3	5.6
	Ile	4.4	4.3
	Ile	2.8	2.5
20	Lys	6.2	6.2
	Leu	8.0	6.8
	Met	0.4	0.6
25	Pro	3.8	3.1
	Arg	4.7	4.3
	Ser	8.1	9.3
	Thr	6.1	6.2
30	Val	4.2	4.3
	Trp	-	0.6
	Tyr	2.4	3.1

35 \* According to Olson et al., 1989

\*\* Residue 20 corresponds to the NH<sub>2</sub>-terminal amino acid of TBPI. Residue 180 is the COOH-terminal residue of TBPI.

40

45

50

55

Table III. Expression of the cell surface and soluble forms of human type I TNF-R in CHO cells

5	CHO cell clone	Specific binding of TNF (CPM/10 <sup>6</sup> cells)	cells expressing human cell surface TNF-R (% fluorescent cells)	human soluble type I TNF receptors (ng/ml)
	nontransfected	180±45	<1%	<0.03
10	C0	175±60	<1%	<0.03
15	It-16	650±60	73%	30
20	It-18	610±10	89%	40

The It-16 and It-18 clones consist of cells transfected with a recombinant expression vector containing cDNA. C0 cells were transfected with a control vector (see Fig. 3). Binding of radiolabelled TNF to the cells was determined in pentuplicate samples. Detection of immunoreactive receptors on the surface of the cells was carried out using combined 17, 18, 20 and 30 anti-TBPI monoclonal antibodies. Results are expressed as percentage of fluorescent cells (background values, obtained by staining the cells with an anti-TNF monoclonal antibody, are subtracted). For other details, see Materials and Methods.

20

## Claims

- 25 1. A method for the production of a soluble recombinant protein selected from human Tumor Necrosis Factor Binding Protein I (TBPI), biologically active precursors and analogs thereof, which comprises:
  - i) transfecting eukaryotic cells with an expression vector comprising a DNA molecule encoding the whole human type I TNF receptor or a soluble domain thereof, and
  - 30 ii) culturing the transfected cells, whereby the desired protein is produced and secreted into the medium.
2. A method according to claim 1 wherein the DNA molecule encoding the whole type I TNF receptor is the cDNA having the sequence depicted in Figure 1D.
- 35 3. A method according to claim 2 wherein the cDNA is introduced into an expression vector and is cotransfected with a recombinant vector containing the dihydrofolate reductase (DHFR) cDNA into DHFR-deficient Chinese hamster ovary (CHO) cells.
4. A method according to claim 3 wherein the cells are selected by growth in a nucleotide-free medium, individual clones are amplified by growth in the presence of methotrexate and the soluble protein secreted into the medium is detected by reaction with monoclonal and polyclonal antibodies raised against TBPI.
- 40 5. A method according to any of claims 1 to 4 wherein the soluble protein secreted into the medium shows a retention time identical to that of TBPI when analyzed by reversed phase HPLC.
6. A method according to any of claims 1 to 5 for the production of human TBPI.
7. A method according to any of claims 1 to 5 for the production of a human TBPI precursor or analog.
- 50 8. A soluble protein selected from precursors and analogs of TBPI which are secreted into the medium of eukaryotic cells transfected with a cDNA encoding the whole type I human TNF receptor or a soluble domain thereof.
- 55 9. A soluble protein as claimed in claim 8 secreted into the medium or CHO cells transfected with the cDNA molecule depicted in Figure 1D.

**A a** Asp Ser Val Cys Pro Gin Gly Lys Tyr Ile His Pro Gin

**b**

GGI	GTC	CCA	TTC	ATA	TAA	GTA	GGI	GT
T	T	G	G	G			T	

**c**

GGA	GTC	CCA	TTC	ATA	TA
C	T	C	T	G	
T	G	T			
G					

**d**

TTC	ATA	TAA	GTA	GGA	GT
T	G	G	G	C	
	T	C			
	T				

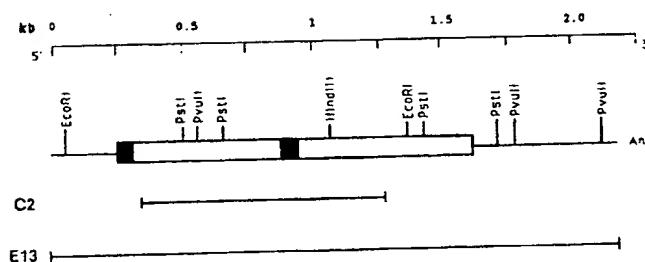
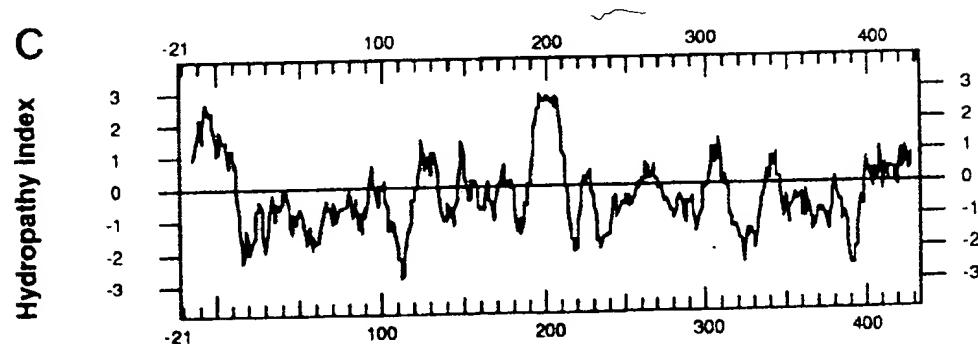
**B****C**

Figure 1 A-C

**D**

18 ACCCCAAAGCCGAACTGGAGCCTAGTCAGAGAAATTCTGAGAAATTAGCAGAGGGGAGAGATCACTGGACCAAGGGCAGTCTATCTPATGCCGAGTGTCAACCCCAA 17  
 136 CTGTACCCCAAGGAACTTGGACCTCCGGACACCCAGATCCGGAACTGGCTAGCCACTGCCCCTGGCAAAATGGGGAGTGAAGGCCATAGCTGCTGGCC 136  
 137 255

-21 -1 +1

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu Leu Val Glu Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu

256 ATG GGC CTC ACC GTG CCT GAC CTG CTG CTC CTG GAG CCC TCA TAC CCC TCA GGA ATA TAC GGG GTT ATT GGA CTG 345  
 \* 10

Val Pro His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Ser Val Cys Pro Glu Lys Tyr Ile His Pro Glu Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr

346 GTC CCT CAC CTA GGG GAC AGG AGA GAG AGA GAT AGT GTG TGT CCC CAA CGA AAA TAT ATC CAC CCT CAA AAT ATC TCG ATT TGC TGT ACC 435

40 50 60

Lys Cys Ile Lys Glu Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Glu Pro Glu Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr

436 AUG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TGG TAC AAT GAC TGT CCA GGC CCC GGG CAG GAT ACC GAC TGC AGG TGT GAG TGT GAG AGC TCC TCC TCC ACC 525

70 80 90

Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Ser Ile Ser Cys Arg Lys Glu Met Gly Cys Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp

526 GCT TCA GAA AAC CAC CTC AGA CAC TGC CTC AAA TGC CCA AAG GAA ATG GGT CAG GTG GAG ATC TCT TCT TCC ACA GTG GAC 615

-100 -110

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Cys Ser Asp Cys Ser Leu Cys Leu

616 CGG GAC ACC GTG TGT GGC TGC AGG AAC CAG TAC ACC TCC CGG CAT TAT TGG AGT GAA AAC CTT TCC CAG TGC TTC ATT TGC AGC CTC CTC 705

110

Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val 130

140 150

160 ATG GGG ACC GTG CAC CTC TCC TGC CAG GAG AAA CAG ANC ACC GTG TGC ACC TCC CAT GCA GTT TCC TTT CTA AGA GAA AAC GAG TGT GTC 795

170 180

Ser Cys Ser Asn Cys Ile Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Glu Ile Glu Asn Val Lys Glu Asp Ser Gly Thr

190 200

796 TCC TGT AGT AAC TGT AAG AAA AGC CTG GAG TGC AGC AGG TGG TGC CTA CCC CAG ATT GAG ATG GTT AAG GCC ACT GAG GAC TCA GGC ACC 805

190

Thr Val Leu Ile Pro Leu Val Ile Phe Gly Leu Cys Leu Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Glu Arg Trp Lys

866 ACA GTG CTC TGG CCC CTC GTC ATT TTC ATT GGT CTC ATT GTC ATT TTA ATT GGT ATT CGC TAC CAA CGG TGG AAG 975

Figure 1 D (part 1)

220	Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys	lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn	240
976	TCC AAG CTC TAC TCC ATT GTT TGT AAA TCC GAA AAA GAG GCG GAG CTT GAA GAA ACT ACT AAG CCG CTC GCC CCA AAC	1065	
250	260	270	
1066	Pro Ser Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val Pro Ser Ser Thr Ser Ser Thr Tyr Thr	1155	
CCA AGC TTC AGT CCC ACT CCA GGC TTC ACC CCC ACC CTC GGC AGT CCC AGT CCC AGT TCC ACC TCC ACC TAT ACC	1155		
280	290	300	
Pro Gly Asp Cys	Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Glu Gly Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala	1245	
1156	CCC GGT GAC TGT CCC AAC TTT GCG GCT CCC CGC GCA CCA CGA GAG GTG GCA CCC TAT CAG GGG GCT GAC CCC ATC CTT GCC ACA GCC CTC GCC	1245	
310	320	330	
Ser Asp Pro Ile Pro Asn Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr	1335		
1246	TCC GAC CCC ATC CCC AAC CCC CTT CAG AAC TGG GAG GAC ACC GCC AAC GCA CAG CCA CAG AGC CTA GAC ACT GAT GAC CCC GCG ACC CTG TAC	1335	
340	350	360	
Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro Leu Arg Trp Iys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gln Ser Asp Asp Ile Asp Arg Leu Glu Leu	1425		
1336	GCC GTG GAG AAC GTG CCC CCC TTG CCC TGG AAG GAA TTC GTG CGG CGC CTC AGC GAC CAC GAG ATC GAT CGG CTG GAG CTG	1425	
370	380	390	
Gln Asn Gly Arg Cys	Leu Arg Glu Ala Gln Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Glu Ala Thr Leu Glu Leu	1515	
1426	CAC AAC CCC CGC CGC GAC GCG CAA TAC AGC ATG CTG CGG ACC TGG ACG CGG CGC AGC CGG CGC GAG CTC GAG CTG	1515	
400	410	420	
Leu Gly Arg Val Val Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly Cys	Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro Pro Ala	1605	
1516	CTG GGA CGC GTG CTC CGC GAC ATG GAC CTG GTC CGC GAG GAC ATC GAG GAG CTC GAG GCG CTC GTC GCG CCC CCC GCG	1605	

Figure 1 D (part 2)

Figure 1 D (part 3)

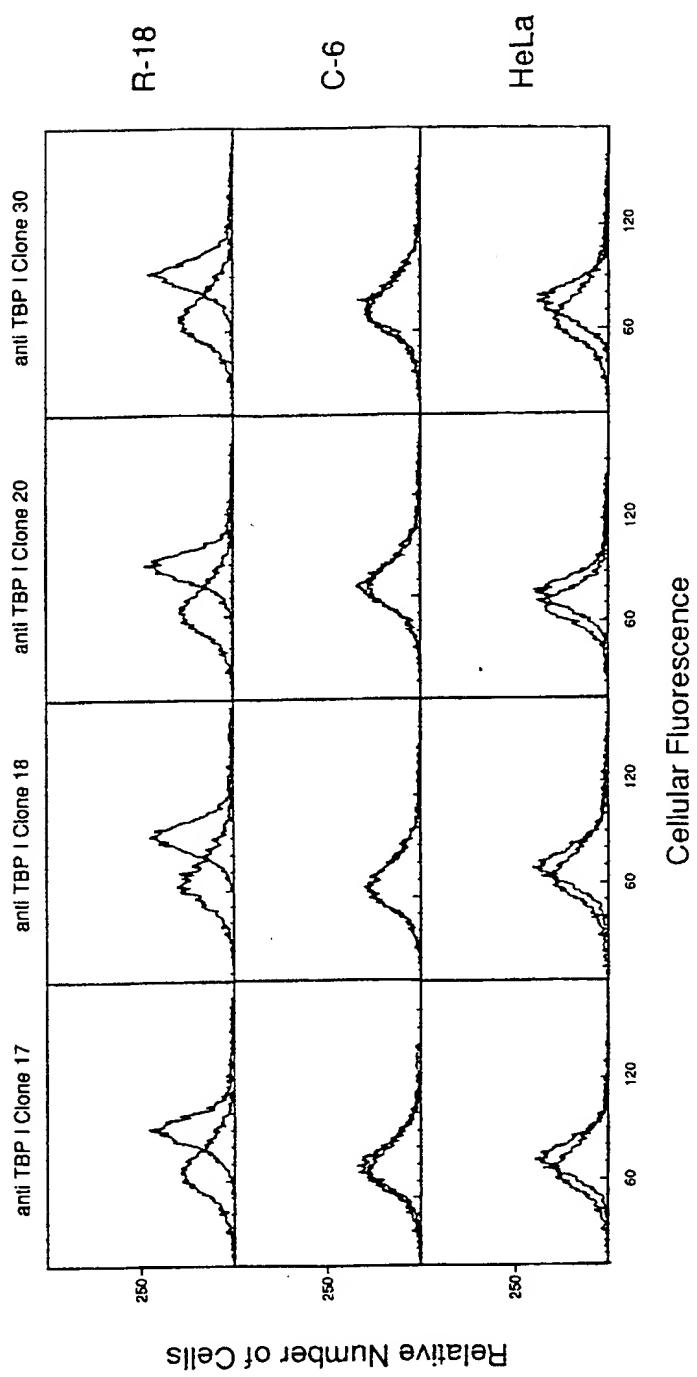


Figure 2

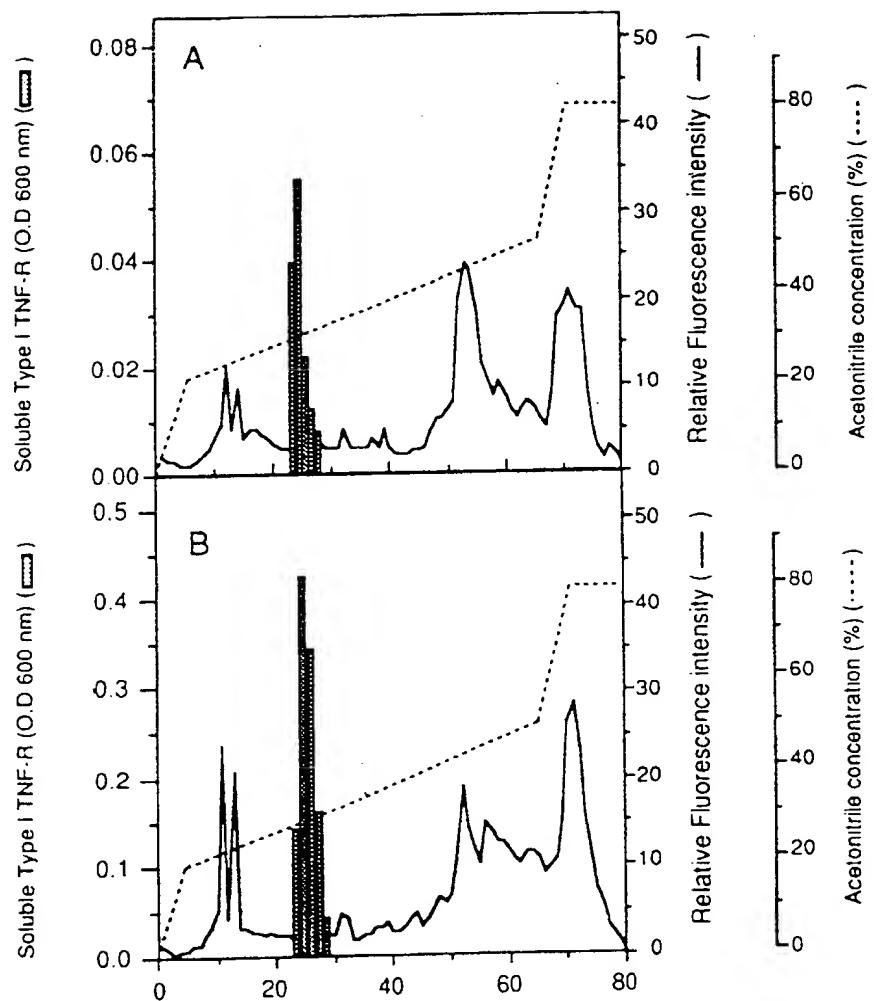


Figure 3

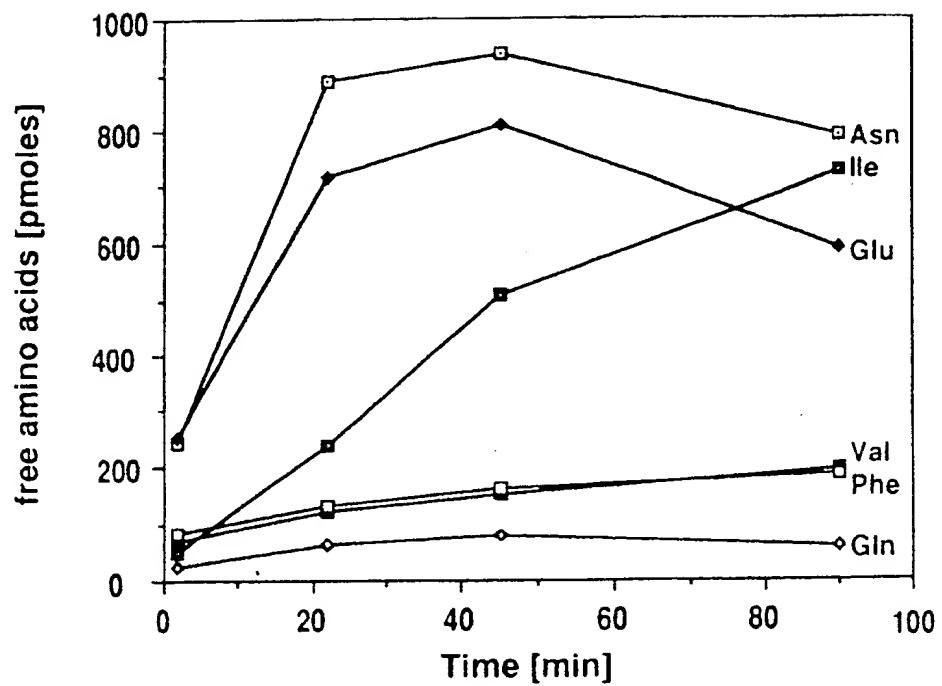


Figure 4

## CONSTRUCTION OF PLASMID pSV-TBP

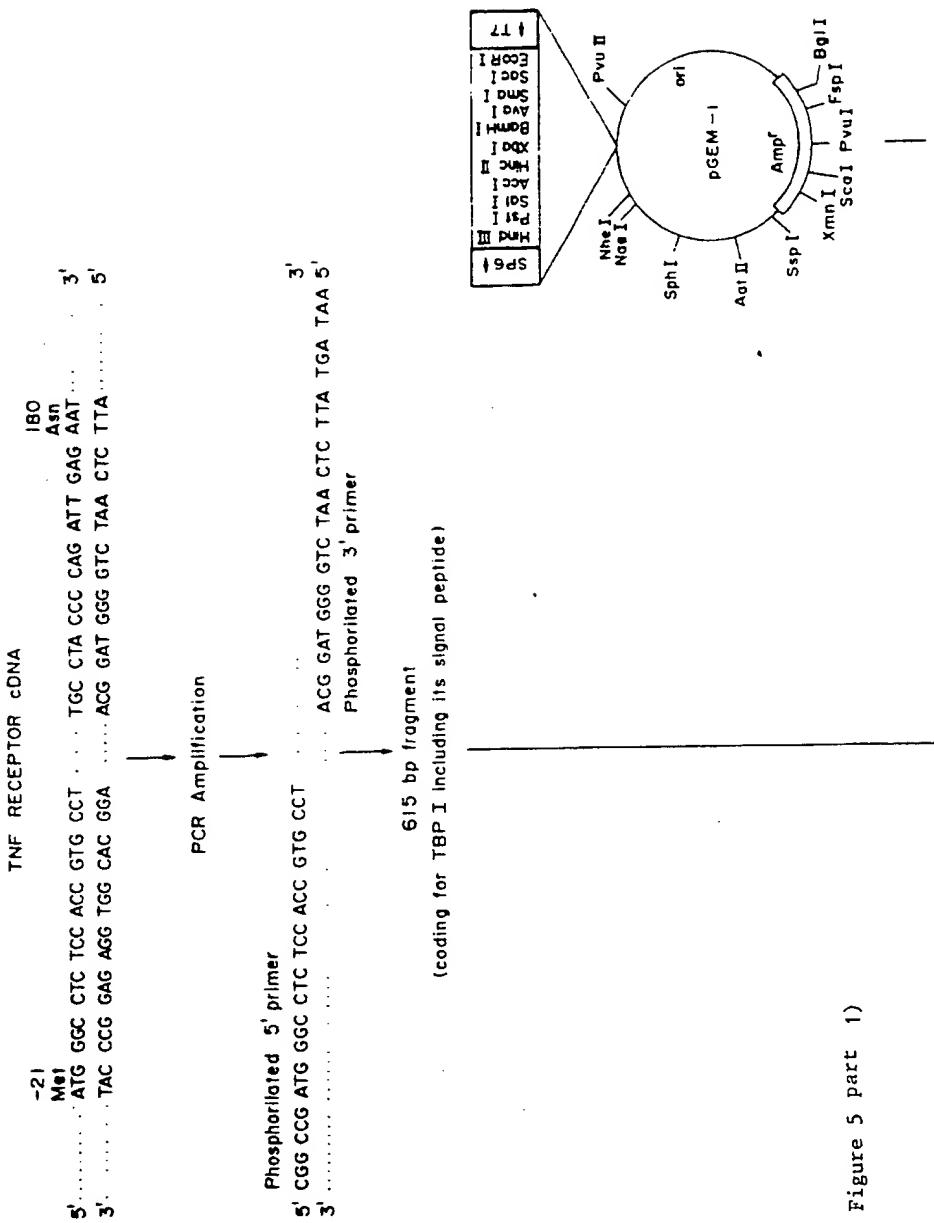


Figure 5 part 1)

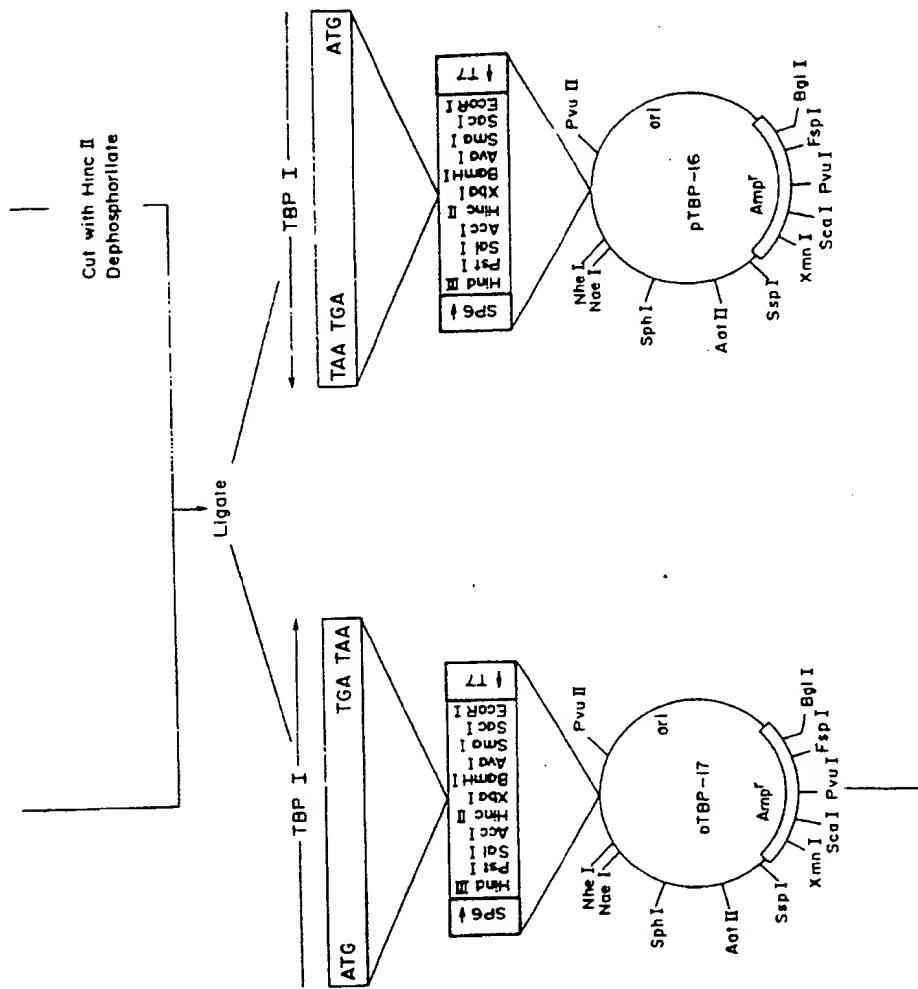


Figure 5 (part 2)

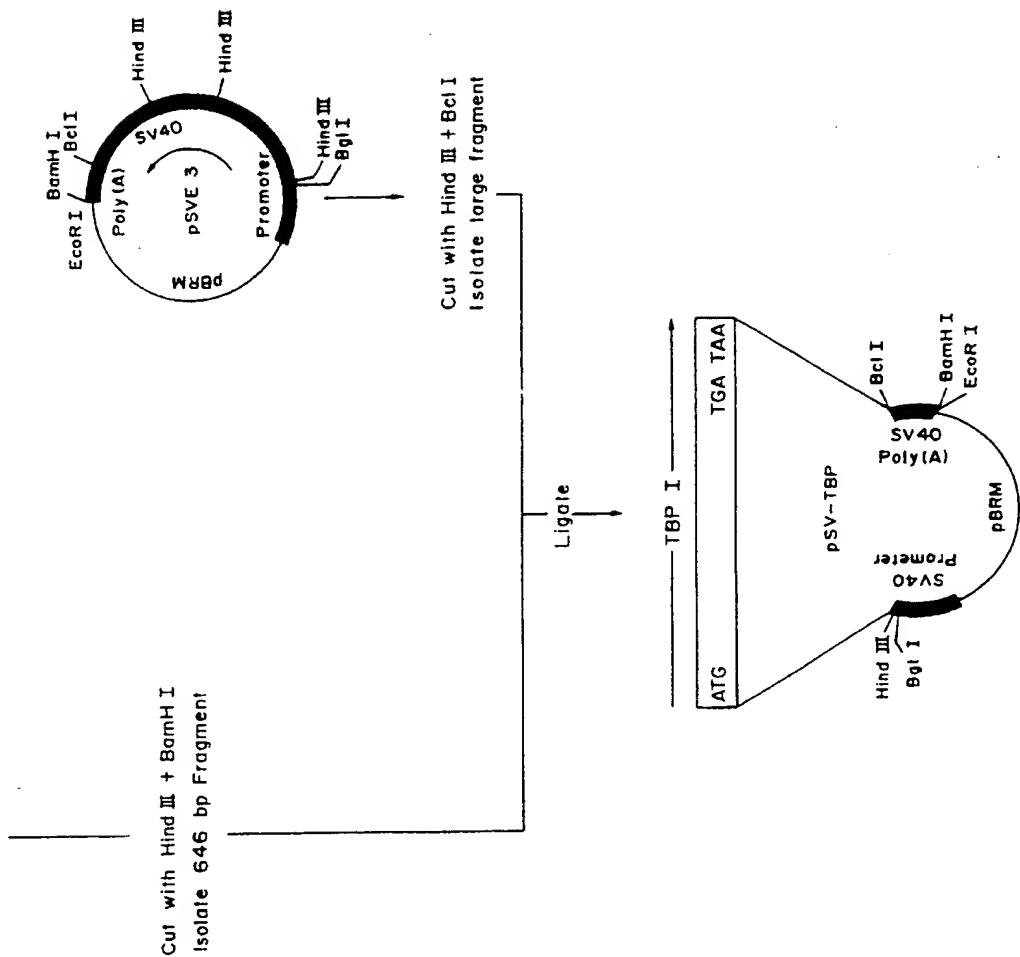


Figure 5 (part 3)

## CONSTRUCTION OF PLASMID PCMV-TBP

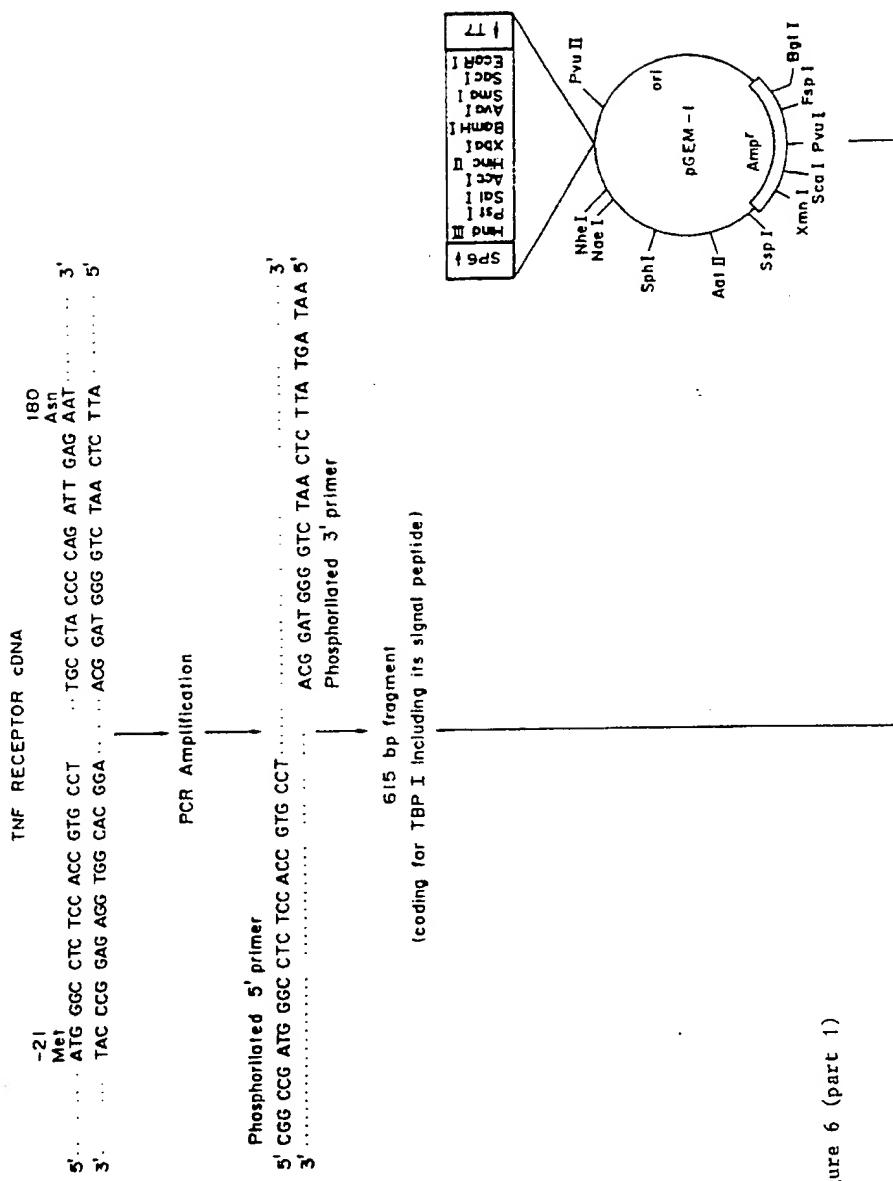


Figure 6 (part 1)

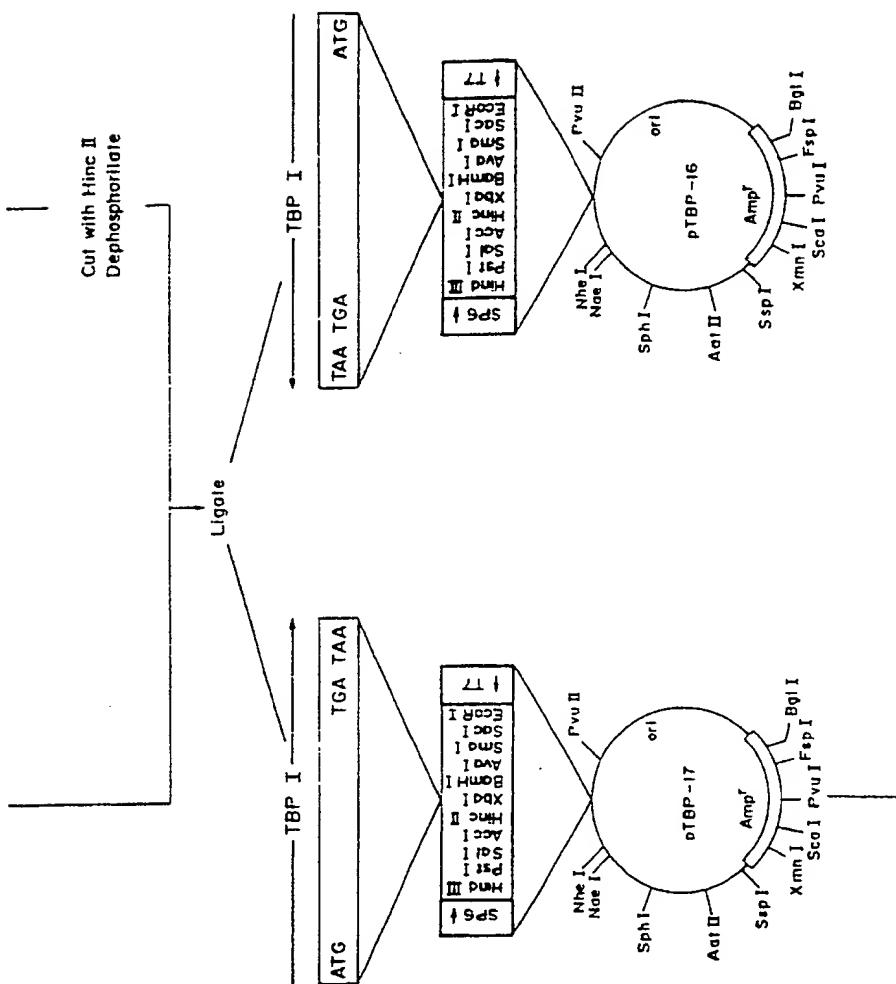


Figure 6 (part 2)

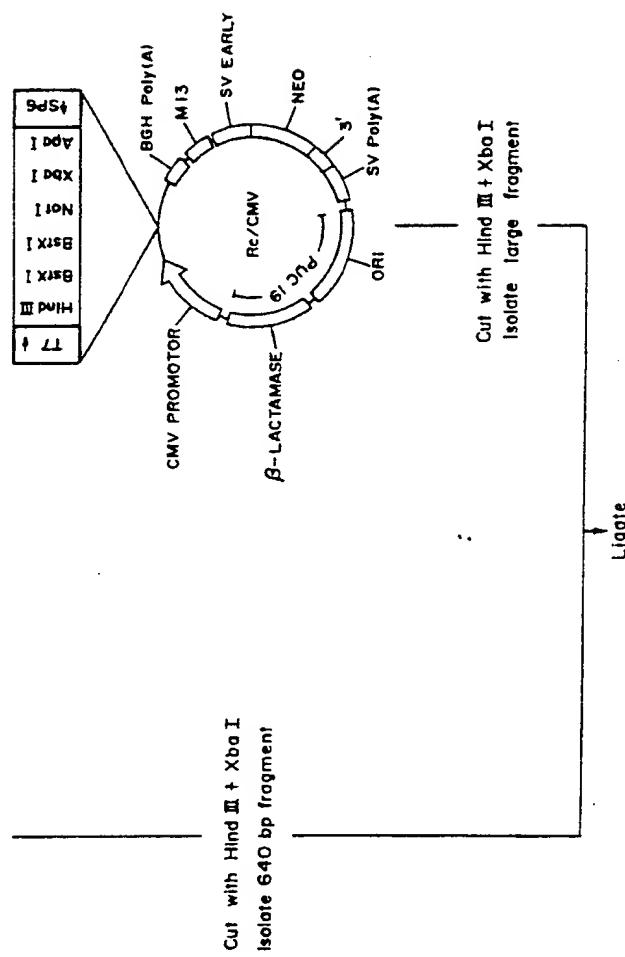


Figure 6 (part 3)

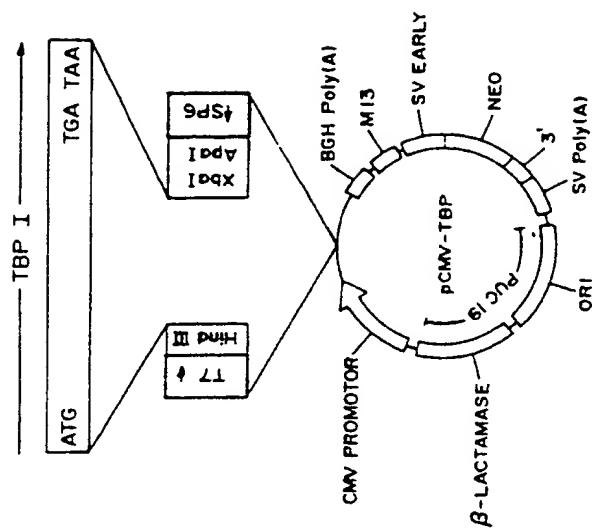


Figure 6 (part 4)



DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl.5)
D,Y	EUROPEAN JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol. 42, no. 3, March 1989, pages 270-275; I. OLSSON et al.: "Isolation and characterization of a tumor necrosis factor binding protein from urine" * Whole document * - - -	1-3,5-9	C 12 N 15/12 C 07 K 13/00 C 12 N 15/79
Y	THE EMBO JOURNAL, vol. 8, no. 9, September 1989, pages 2497-2502; C. BINKERT et al.: "Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding a novel insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-2)" * Summary * - - -	1-3,5-9	
P,X	CELL, vol. 61, 20th April 1990, pages 351-359, Cambridge, MA, US; H.R. LOETSCHER et al.: "Molecular cloning and expression of the human 55kd tumor necrosis factor receptor" * Summary; figure 2; Experimental procedures * - - -	1,2,5-9	
P,X	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 87, 14th November 1990, pages 8781-8784, US; T. GATANAGA et al.: "Purification and characterization of an inhibitor (soluble tumor necrosis factor receptor) for tumor necrosis factor and lymphotoxin obtained from the serum ultrafiltrates of human cancer patients" * Whole document * - - -	1,2,5	
P,X	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 265, no. 10, 5th April 1990, pages 5708-5717, US; R.A. HELLER et al.: "Amplified expression of tumor necrosis factor receptor in cells transfected with Epstein-Barr virus shuttle vector cDNA libraries" * Abstract; page 5173, column 2, paragraph 2; page 5174, column 1, paragraph 1: "Discussion" * - - - -/-	1-3,6-9	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl.5)  C 12 N C 07 K
The present search report has been drawn up for all claims			
Place of search	Date of completion of search	Examiner	
The Hague	27 February 91	NAUCHE S.A.	
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS			
X: particularly relevant if taken alone		E: earlier patent document, but published on, or after the filing date	
Y: particularly relevant if combined with another document of the same category		D: document cited in the application	
A: technological background		L: document cited for other reasons	
O: non-written disclosure			
P: intermediate document			
T: theory or principle underlying the invention		B: member of the same patent family, corresponding document	

EUROPEAN SEARCH  
REPORT

Application Number

EP 90 12 4133

## DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl.5)								
A	<p>EUROPEAN JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol. 41, no. 5, November 1988, pages 414-419; C. PEETRE et al.: "A tumor necrosis factor binding protein is present in biological fluids"</p> <p>* Whole document *</p> <p>-----</p>	1-9									
The present search report has been drawn up for all claims											
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%;">Place of search</td><td style="width: 33%;">Date of completion of search</td><td colspan="2" style="width: 34%;">Examiner</td></tr> <tr> <td>The Hague</td><td>27 February 91</td><td colspan="2">NAUCHE S.A.</td></tr> </table>				Place of search	Date of completion of search	Examiner		The Hague	27 February 91	NAUCHE S.A.	
Place of search	Date of completion of search	Examiner									
The Hague	27 February 91	NAUCHE S.A.									
<p style="text-align: center;">CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</p> <p>X: particularly relevant if taken alone</p> <p>Y: particularly relevant if combined with another document of the same category</p> <p>A: technological background</p> <p>O: non-written disclosure</p> <p>P: intermediate document</p> <p>T: theory or principle underlying the invention</p> <p>E: earlier patent document, but published on, or after the filing date</p> <p>D: document cited in the application</p> <p>L: document cited for other reasons</p> <p>B: member of the same patent family, corresponding document</p>											

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-78396

(43)公開日 平成5年(1993)3月30日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>  
C 0 7 K 13/00  
C 1 2 P 21/02  
// C 1 2 N 15/12  
(C 1 2 P 21/02

識別記号 庁内整理番号  
7731-4H  
Z N A C 8214-4B

F I

技術表示箇所

8828-4B

C 1 2 N 15/ 00

A

審査請求 未請求 請求項の数 9(全 21 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平2-419240

(71)出願人 591015175

(22)出願日

平成2年(1990)12月13日

イエダ リサーチ アンド デベロップメント カンパニー リミテッド  
イスラエル国レホボト ビー オー ポツクス 95

(31)優先権主張番号 0 9 2 6 9 7

(32)優先日 1989年12月13日

(72)発明者 デビッド ワラツク

(33)優先権主張国 イスラエル (IL)

イスラエル国 レホボット, ポロチョフ  
ストリート24

(31)優先権主張番号 0 9 5 0 6 4

(32)優先日 1990年7月12日

(72)発明者 ヤロン ノツブハ

(33)優先権主張国 イスラエル (IL)

イスラエル国 ラヌット ガン, ピアリツ  
ク ストリート, 56

(74)代理人 弁理士 浅村 鮎 (外3名)

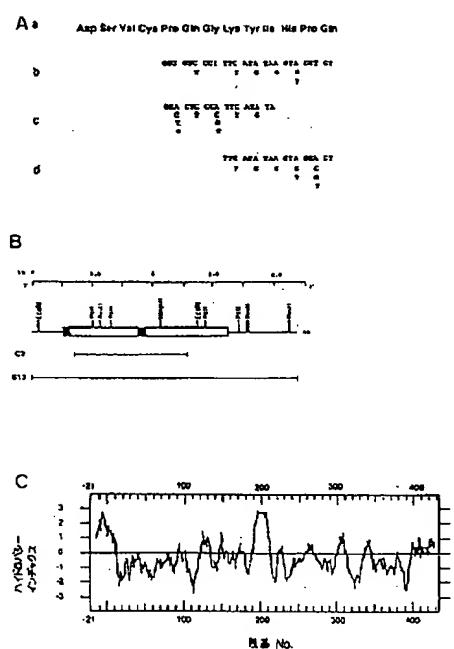
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト腫瘍壞死因子結合蛋白

(57)【要約】 (修正有)

【目的】ヒト腫瘍壞死因子結合蛋白I (TBP-I) の  
製造法及びTBP-Iの前駆体並びに類似体を提供す  
る。

【構成】全1型ヒトTNFレセプターもしくはその可溶  
性領域をコードするDNA分子を含む発現ベクターで真  
核細胞をトランスフェクションし、次いで該トランスフ  
ェクションされた細胞を培養して可溶性蛋白を培地へ分  
泌させることによって、TBP-I、その前駆体及びそ  
の類似体が製造される。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】ヒト腫瘍壞死因子結合蛋白I (TBP-I)、及びその生物学的に活性な前駆体と類似体より選択される可溶性組換え蛋白の产生方法において、

- 1) 全I型ヒトTNFリセプター又はその可溶性領域をコードするDNA分子による発現ベクターで真核細胞をトランسفエクションし、
- 2) 該トランسفエクションされた細胞を培養し、もって目的の蛋白を产生させ、培地に分泌させる、ことによりなる、上記方法。

【請求項2】全I型ヒトTNFリセプターをコードするDNA分子は、図1Dに記載の配列を有するcDNAである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】該cDNAは発現ベクターに導入され、ジヒドロフォレートリダクターゼ (DHFR) cDNAを含有する組換えベクターで、DHFR-欠損チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞にコトランسفエクション (cotransfection) される、請求項2に記載の方法。

【請求項4】該細胞はヌクレオチドを含まない培地中での増殖により選択され、各クローンはメソトレキセート (methotrexate) 存在下での増殖により増幅され、増殖培地中に分泌される該可溶性蛋白は、TBP-Iに対するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体との反応により検出される、請求項3に記載の方法。

【請求項5】培地中に分泌される可溶性蛋白は、逆相HPLCで分析するときTBP-Iと保持時間が同じである、請求項1から4までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】ヒトTBP-Iの产生のための請求項1から5までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】ヒトTBP-Iの前駆体又は類似体の产生のための請求項1から5までのいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】全I型ヒトTNFリセプター又はその可溶性領域をコードするcDNAでトランسفエクションされた真核細胞の培地中に分泌されるTBP-Iの前駆体及びその類似体から選ばれる可溶性蛋白。

【請求項9】図1Dに記載されるcDNA分子でトランسفエクションされたCHO細胞の増殖培地中に分泌される請求項8の可溶性蛋白。

## 【発明の詳細な説明】

## 【産業上の利用分野】

【0001】本発明は、ヒト腫瘍壞死因子 (TNF) 結合蛋白I (以下、TBP-Iと称する) に関し、更に詳しくは該蛋白をコードする遺伝子のクローニングと、宿主細胞中での該蛋白の発現に関する。

## 【0002】

【従来の技術】TNF- $\alpha$ とTNF- $\beta$  (リンフォトキ

シン) は構造上関連のあるポリペプチド性サイトカインであり、主に単核白血球により産生され、その細胞機能への作用は炎症応答の誘導において主要な因子であることである。TNF類は異なる方法で細胞に作用し、そのあるものは他の炎症メディエーター (例えばインターロイキン-1 (IL-1) とインターロイキン-6 (IL-6)) の作用様式に似ている。TNF類の活性に関して最も特徴的と思えるものは、その作用の多くは細胞や組織の破壊につながることである。これらの破壊的活性の過剰誘導は多くの疾患の病因となっているという証拠が増加していることは、その機構と制御方法を解明することを興味あるものにしている (Old, L. J. (1988) Sci. Am. Vol. 258, p 41-49)。

【0003】TNF- $\alpha$ とTNF- $\beta$ の結合する高親和性リセプター (Beutler, B. A. et al. (1985) J. Exp. Med. Vol. 161, p 984-995) は、これらのサイトカインに対する応答の開始と調節に中心的な役割を果たしている。これらのリセプターは種々の異なる細胞の表面上に発現されている。これらの細胞外部分と反応する抗体は、TNF類に非常に似た方法で細胞に作用することを証明している研究は、それらに関連したリセプターや細胞成分は、TNF類の作用の細胞内シグナルを与えるのに充分であることを示している (Espevirk, T., et al. (1990) J. Exp. Med. Vol. 171, p 415-426)。

【0004】他の研究はTNFリセプターに関連した分子 (TNF-Rs) はまた、可溶性の型で存在することを証明している。このような可溶性TNF-Rsの免疫学的に異なる2つの種 (TNF結合蛋白IとII、即ちそれぞれTBP-IとTBP-II) が、最近ヒトの尿から単離された (Engelmann, H., et al. (1989) J. Biol. Chem. Vol. 264, p 11974-11980; Engelmann, H., et al. (1990) J. Biol. Chem. Vol. 265, p 1531-1536; OIsson, I., et al. (1989) Eur. J. Haematol. Vol. 42, p 270-275; Seckinger, P., et al. (1989a) J. Biol. Chem. Vol. 264, p 11966-11973)。免疫学的証拠はこの2つの蛋白は、細胞表面TNF-Rの2つの分子種 (それぞれI型とII型のリセプター) に、構造的に関連していることを示している。この2つの可溶性蛋白のそれぞれに対する抗体は、2つのリセプターの1つに対するTNFの結合を特異的に阻止することが証明されており、リセプターを免疫沈降させるのに使用することができる。この2つの可溶性蛋白の1つ (TBP-I) に対する抗体はまた、免疫学的に交差反応性のある細胞リセ

プターを発現する細胞中でTNFに特徴的な作用を誘導することが見いだされた(Engelmann, H., et al., (1990) 同上)。TNFの細胞表面リセプターのように、これらのリセプターの可溶性型は特異的にTNFに結合し、もってその細胞への結合を妨害することができる。これらはTNF活性の生理学的インヒビターとして機能することが示唆された(Engelmann et al., 1989 (同上); OIssson et al., 1989 (同上); Seckinger et al., 1989a (同上))。

【0005】細胞表面リセプターの可溶性型は、蛋白分解により、又はIL-4とIL-7に対するリセプターのcDNAのクローニングについて記載している最近の2つの研究で提唱された異なる機構により、リセプターの細胞表面型から得られる。リセプターの全長をコードするcDNAクローニングに加えて、これらのリセプターの先端を切った(truncated)、可溶性型をコードするクローニングもまたこれらの研究で単離された。後者のクローニングは、リセプターの可溶性型を特異的にコードする転写体(transcript)由来であり、細胞表面型をコードする同じ遺伝子から転写されるが、スプライシング(splicing)が異なることが示唆されている(Mosley, B., et al., (1989) Cell Vol. 59, p335-348; Goodwin, R. G., et al., (1990) Cell Vol. 60, p941-951)。

【0006】最近の2つの研究でヒトI型TNF細胞表面リセプターの分子クローニングと発現が記載された(Loetscher, H., et al. (1990) Cell Vol. 61, p351-359; Schall, T. J., et al., (1990) Cell Vol. 61, p361-370)。

#### 【0007】

【発明の要旨】本発明は、ヒトTBP-1、その前駆体及びその類似体の製造法であって、真核細胞、好ましくはCHO細胞を、全I型ヒトTNFレセプターまたはその可溶性領域をコードするDNA分子を含む発現ベクターでトランスフェクションすることを含む該製造法に関する。全DNA分子を用いる場合には、該トランスフェクションされた細胞から、細胞表面レセプターとともに可溶性蛋白が産生され、培地中に分泌される。

【0008】更に本発明は、全ヒトI型TNFレセプターまたはその可溶性領域をコードするDNA分子でトランスフェクションされた真核細胞により培地中に分泌されるTBP-1の前駆体及びその類似体から選ばれる可溶性蛋白に関する。

#### 【0009】図面の説明

図1はI型TNFリセプター-cDNAのヌクレオチド配列と、コードされた蛋白の予想されるアミノ酸配列を示す。

【0010】(A)は、該cDNAのスクリーニングに使用されるプローブを示し、ここで：

(a)はTBP-IのNH<sub>2</sub>-末端アミノ酸配列を示し；(b)は、NH<sub>2</sub>-末端アミノ酸配列に基づいてデザインした、最初のスクリーニングに使用される合成オリゴヌクレオチドプローブを示し、(c)と(d)は、(b)と重複するプローブであり、最初のスクリーニングで単離されたクローニングの正当性を確認するために使用される。

【0011】(B)はヒトの大腸(C2)とCEM-リンパ球(E13)ライブラリーから単離されたcDNAクローニングと、完全なcDNA構造の模式図である。翻訳されていない配列は線で示してある。コード領域は四角で囲ってある。影をつけた部分は、シグナルペプチドと経膜領域(transmembrane domain)をコードする配列を示す。

【0012】(C)はTNFリセプターの予想されるアミノ酸配列のハイドロバシープロファイル(hydrophathy profile)を示す。疎水性(線の上)と親水性(線の下)の値は、ウィスコンシン大学遺伝子学コンピューターグループのKyteとDoolittle(1982)の配列解析ソフトウェアを用いて求めた。曲線は、9つの残基上の各残基の疎水性指数の平均である。

【0013】(D)はI型TNFリセプターのヌクレオチドと、予想されるアミノ酸配列を示す。推定される開始シグナルと停止シグナルは星印で示してあり；TBP-I由来の3つの配列は上に破線で示してあり；経膜領域とリーダー領域は角の丸い四角で囲ってあり；細胞外領域の4つの繰り返し配列は、太い下線で示してある。サイトカイン残基は四角で囲ってある。グリコシル化部位は上に線が引いてあり、推定されるポリアデニル化シグナルは下線で示してある。

【0014】図2は、E13cDNAでトランスフェクションされたCHO細胞中での、TBP-Iに対するモノクローナル抗体を使用しての、I型TNF-Rの検出を示す。

【0015】CHO細胞、クローニングR-18(発現ベクターでトランスフェクションされており、E13cDNAはSV40プロモーターの調節下にある)とC-6(対照：発現ベクターでトランスフェクションされた細胞のクローニングであり、E13は逆の配向である)、そしてHeLa細胞を、抗TBP-Iモノクローナル抗体17、18、20そして30で染色した後、FITC結合抗マウスF(ab)でインキュベートした。染色の最初の段階で対照としてTNFに対するモノクローナル抗体を使用して観察されたものと、蛍光強度と比較した。

【0016】図3は、I型TNF-RのCHO-産生、可溶性型の逆相HPLCを示す。

【0017】CHOR-18クローニング(図2参照)の調

整培地の濃縮物と、純粋な3ngのTBP-Iを添加したCHOC-6クローンの濃縮物を、Aquaporin RP300カラムにかけた。0.3%のトリフルオロ酢酸の可溶性型を測定した(図4) (例1に記載の方法による:操作法)。

TBP-Iを添加しない時、CHOC-6クローンの濃縮物の溶出画分はいずれも、検出されるだけの可溶性型のリセプターを含んでいないことがわかった(示していない)。

【0018】図4は、カルボキシペプチダーゼYによるTBP-IのCOOH-末端のアミノ酸の放出の経時変化を示す。

【0019】図5は、プラスミッドpSV-TBPの作成を示し、これは強いSV40初期遺伝子プロモーター(strong SV40 early gene promoter)と融合した、TBP-IをコードするDNA配列を含有する。

【0020】図6は、プラスミッドpCMV-TBPの作成を示し、これはサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターと融合した、TBP-IをコードするDNA配列を含有する。

【0021】

【発明の説明】ヒトの尿から単離された精製TBP-Iは、本出願人による日本特許出願No.228307/88に記載されており、図1Aaに示すN-末端アミノ酸配列を含むことが証明された。

【0022】いまやTBP-IのCOOH-末端が決定され、配列Ile-Glu-Asn(図1Dの178-180位に上に破線が引いて示されている)を含む主要な画分と、少なくとも1つの小さな画分(さらに少なくとも2つのアミノ酸Val-Lysを181-182位に含む)を含むことが証明された。

【0023】本発明は、ヒト腫瘍壞死因子結合蛋白I(TBP-I)、及びその生物学的に活性な前駆体と類似体より選択される可溶性組換え蛋白の产生方法に関し、

1) 全I型ヒトTNFリセプター又はその可溶性領域をコードするDNA分子による発現ベクターで真核細胞をトランスフェクションし、

2) 該トランスフェクションされた細胞を培養し、もって目的の蛋白を産生させ、培地に分泌させる、ことによりなる。

【0024】全I型ヒトTNFリセプターをコードするDNA配列は図1Dに記載されている。その可溶性領域は180位(Asn)又は182位(Lys)までの配列、又は182位以後にいくつかのアミノ酸を追加的に含む配列を含む。

【0025】本発明の方法によりトランスフェクションされた細胞により産生され、培地中に分泌される可溶性蛋白は、N-末端に、図1D(TBP-I)の20-23位に上に破線で示してある配列Asp-Ser-Val

酸水溶液中のアセトニトリルのグラジェントで溶出した(……)。画分の蛋白含量(—)とELISAにより

例1に記載の方法による:操作法)。T

I、又は9-11位の配列Leu-Val-Pro、又は1-3位のIle-Tyr-Pro、又はIle(+1)とAsp(20)の間の任意の他の配列を有してもよい。この蛋白はCOOH-末端に上記の任意の配列を有してもよい。TBP-I様の活性を有し生物学的に活性な場合は、これらのすべての可溶性蛋白は、TBP-Iの前駆体及び類似体として本発明に包含される。

【0026】本発明によれば、TBP-IのNH<sub>2</sub>-末端に基づいてデザインされたオリゴヌクレオチドプローブは、公知の方法で合成され、cDNAライブラリー中の、TBP-IをコードするcDNAのスクリーニングのために使用した。ヒトの大腸のcDNAライブラリー中に、該プローブとハイブリダイゼーションするC2cDNA挿入体が見いだされ、これをさらに、ヒトCEM-リンパ球ラムダZAP-cDNAライブラリーでスクリーニングするために使用し、図1Dに示すcDNAに到達した。

【0027】次に当業者に公知の方法を使用して、適当に作成した発現ベクター中に、陽性クローンのDNAを挿入した。目的の蛋白の発現を可能にするため、該蛋白の遺伝子発現と産生を可能とするような方法で、該目的の蛋白をコードするDNAに結合した転写及び翻訳制御情報を含有する特異的ヌクレオチド配列を、発現ベクターは含有していないなければならない。遺伝子が転写されるためにはその前にプロモーターがなければならない。多種のこののようなプロモーターの使用が可能であり、異なる効率で作用する(強いプロモーター及び弱いプロモーター)。

【0028】シグナルペプチドのヌクレオチド配列と、機能的に結合した転写と翻訳制御シグナルがその前に存在する、TBP-Iのアミノ酸配列を含む蛋白(即ちTBP-I、又はその前駆体及び類似体)をコードするヌクレオチド配列よりなるDNA分子を、宿主細胞染色体中に目的の遺伝子配列を組み込むことができるベクターの中に挿入する。その染色体中に導入されたDNAを安定的に組み込んだ細胞は、発現ベクターを含有する宿主細胞の選択を可能にする1つ又はそれ以上のマーカーを導入することにより、選択される。

【0029】好適な態様において、導入されたDNA分子は、受容体宿主中の自律的増殖が可能なプラスミッド又はウイルスベクター中に組み込まれる。特定のプラスミッド又はウイルスベクターの選択にさいして重要な因子は、ベクターを含有する受容体細胞の認識や、ベクターを含まない受容体細胞からの選択が容易であること;特定の宿主中で望ましいベクターのコピー数、そし

て異なる宿主細胞間でベクターを「シャトル」("shuttle") できることが好ましいか否かである。発現のためにベクター、又は作成体を含むDNA配列がいったん調製されると、種々の適当な手段で適当な宿主細胞中に、DNA作成体が導入される(形質転換、トランスフェクション、結合、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション(electroporation)、リン酸カルシウム沈澱、直接マイクロインジェクションなど)。

【0030】本発明で使用される宿主細胞は真核細胞又は原核細胞でもよい。例えば細菌(大腸菌(E. coli))のような原核細胞宿主は、細胞をトランスフェクションするのにI型TNFリセプターの可溶性領域をコードするcDNAが使用される時のみ、使用される。このような条件下では、該蛋白はグリコシル化されない。原核細胞宿主は、発現プラスミッド中のレブリコンと調節配列に対して融和性がなければならない。

【0031】真核細胞宿主は、全I型TNFリセプターをコードするcDNAよりなるプラスミッドで、本発明に従いトランスフェクションされる。好適な真核細胞宿主は哺乳動物の細胞(例えばヒト、サル、マウス及びチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞)である。これらは細胞表面リセプターに加えて、該蛋白の可溶性型を与え、蛋白分子に対して翻訳後の修飾(例えば正しい部位での正しい折たたみ又はグリコシル化を含む)を与える。真核細胞は、I型ヒトTNFレセプター分子の可溶性領域をコードするcDNAを含むプラスミッドでトランスフェクションすることもできる。本発明において好適な哺乳動物細胞はCHO細胞である。

【0032】ベクターの導入後に、宿主細胞は選択培地で増殖され、もってベクター含有細胞の増殖を選択する。クローニング遺伝子配列の発現により、目的の可溶性蛋白が産生され、これが培地中に分泌され、次に任意の従来法(例えば抽出、沈降、クロマトグラフィー、電気泳動など)で単離・精製される。

【0033】好適な様態において、CHO細胞は図1Dに示すI型TNF-RcDNAでトランスフェクションされ、これらが細胞表面リセプターとTBP-I、その可溶性型、及び/又はその前駆体及び類似体を産生する。

【0034】本出願に示したデータは、I型TNF-Rの可溶性型のTBP-Iはこのリセプターの細胞表面型の断片を構成し、その細胞外領域に相当するという考え方方に一致する。このリセプターは、この蛋白の数種の位置的に異なるエピトープと相互作用をするTBP-Iに対する数種のモノクローナル抗体により認識される。該細胞外領域のアミノ酸配列は、TBP-Iの配列に一致する。

【0035】TBP-Iの形成機構に関して特に有用な知見は、本出願に記載された、TNF-Rの可溶性型は

TNF-RcDNAでトランスフェクションされたCHO細胞により産生されるという知見である。これは、細胞表面型をコードするのと同じ転写体がTNF-Rの可溶性型の形成を可能にする何らかの機構を細胞が所有していることを示している。

【0036】E13でトランスフェクションしたCHO細胞による可溶性型のI型TNF-Rの低い産生速度は、必ずしも最高速度を反映したものではない。HT29細胞では可溶性型のI型TNF-Rの自然の放出は、CHO-R-18クローニングで観察された速度より約10倍速い速度で起きる。

【0037】細胞表面型をコードするのと同じ転写体から可溶性型のTNFリセプターが得られるのに可能性のある機構は、蛋白分解である。事実TBP-IのNH<sub>2</sub>-末端に対応するアミノ酸残基に隣接して、リセプターのアミノ酸配列内に、トリプシン様プロテアーゼによる切断部位となる2つの基本的なアミノ酸残基(Lys-Arg)がある。TBP-IのCOOH末端で起きる切断を引き起こすプロテアーゼについては不明である。

【0038】以下の例により本発明を例示する。

【0039】例1:操作法

A) TNF結合蛋白TBP-IとTBP-II内のアミノ酸配列の決定

TNF結合蛋白TBP-IとTBP-IIはすでに記載されているように(Engelmann, H., et al. (1990) J. Biol. Chem. Vol. 265, p 1531-1536)、リガンド(TNF)アフィニティクロマトグラフィーの後に逆相HPLCを用いる方法により、尿の蛋白の濃縮調製物から単離した。TBP-Iを臭化シアンで切断して2つのペプチドを得た後、還元とアルキル化を行い、逆相HPLCで単離した。この2つのペプチド(表1のCNBr-1とCNBr-2)をパルス液体気体蛋白マイクロシーケンサー(pulsed liquid gas phase protein microsequence r) (モデル475A, Applied Biosystems Inc., Foster City CA)でNH<sub>2</sub>-末端配列解析を行った。該ペプチドの1つ(CNBr-1)の配列は、全TBP-I蛋白のNH<sub>2</sub>-末端と同じであった。

【0040】TBP-I中のCOOH-末端アミノ酸配列は、カルボキシペプチダーゼYで蛋白を消化した後、放出されたアミノ酸の配列解析を行い決定した。純粋なTBP-I(3.2μg)を1nmoleのノルロイシン(norleucine)(内部標準物質として)と混合し、完全に乾燥し、0.8μgのカルボキシペプチダーゼY(Sigma, St. Louis, MO)を含有する8μlの0.1M酢酸ナトリウム緩衝液、pH5.5中に再懸濁した。消化は室温で行った。異なる時間に2μlずつ採取して、3μlの10%酢酸を添加して酸

性にした後、 $15\mu\text{l}$ の0.5%EDTAを添加した。次に自動アミノ酸解析を行った(Applied Biosystems, U. K. モデル420A)。その結果(図4に示す)は配列-Ile-Glu-Asn-COOHを示す。2つ又はそれ以上のアミノ酸を追加的に含有する小さな画分が検出された。

【0041】TBP-I内に配列は、蛋白のトリプシン分解ペプチドを作成して決定した。純粋なTBP-I(200 $\mu\text{g}$ )の試料を還元し、アルキル化し、Aquaporin RP-300逆相HPLCカラムで精製した。修飾された蛋白を含有する画分を集めて、NaHCO<sub>3</sub>でpHを8.0に調整した。酵素対基質比1:20(W/W)で室温で16時間、TPCKトリプシン(238U/mg, Millipore Corp., Freehold, NJ)で消化した。消化物をC18RP-P逆相HPLCカラム(Synchrom, Linden, NJ)にかけ、該ペプチドを0.3%トリフルオロ酢酸水溶液中の0から40%のアセトニトリルの直線勾配で分離した。該ペプチドと無傷(intact)の蛋白(N-末端)のNH<sub>2</sub>-末端アミノ酸配列を表1に示す。ペプチドは、RP-Pカラムからの溶出の順番に番号をつけた。配列の不均一性が観察された39、44、46、53そして54の画分では、主要な配列とそれ以下の配列も示してある。

#### 【0042】b) cDNAクローンの単離

TBP-I(図1Aa)のNH<sub>2</sub>-末端アミノ酸配列から得られたスクレオチド配列から作成される合成オリゴスクレオチドプローブの3つの混合物(図1Ab, 1Ac)を、cDNAライブラリーのスクリーニングに使用した。コドンがあいまいなため4つのスクレオチドが考えられる場合はデオキシイノシンを導入して、48倍縮重、26量体で最初のスクリーニングを行った(図1Ab)。26塙基プローブに対応する配列の一部を構成する2つの重複アミノ酸配列に対応して、96縮重と128縮重を有する2つの混合17量体スクレオチド配列とのハイブリダイゼーションを試験することにより、陽性クローニングの正当性を評価した(図1Acとd)。縮重プローブで単離した部分的cDNAクローンの最も長いクローンの5'末端に近接している配列に対応するオリゴスクレオチドプローブ(図1D中のスクレオチド478-458)を、全長cDNAクローンのcDNAライブラリーをさらにスクリーニングするために適用した。T4ポリスクレオチドキナーゼを用いるプローブの32P標識、細菌集落上へのファージのプレーティング(painting)、放射標識プローブを使用してのそれらのスクリーニング、陽性クローンの単離、そしてcDNA挿入体のサブクローニングは、標準的方法に従い実施した(Sambrook, J., et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press)。

#### 【0043】c) cDNAクローンのスクレオチド配列

陽性ラムダGT11組換えファージから単離されたcDNA挿入体を、pBlue script KS(-)ベクター中にサブクローニングした。ラムダZAPファージ中に見いだされた挿入体は、R408ヘルパーファージ(Short, J. M., et al. (1988) Nucleic Acids Res. Vol. 16, p 7853-7600)を用いて、プラスミッドpBlue script SK(-)ベクターを切断することにより取り出した。両方向への配列決定は、ジオキシ鎖停止方法により行った。cDNAをエキソスクレアーゼIII("Erase a base"キット、Promega Biotech, Madison, WI)で消化して、両方への配向のcDNAの、重複する欠失クローンを作成した。R408ファージを用いて得られる1本鎖錆型は、T7DNAポリメラーゼ配列決定法(Promega)により、配列を決定した。

#### 【0044】d) CHO細胞中のI型ヒトTNF-Rの構成的発現

修飾したpSVL発現ベクター中へE13挿入体を導入した。リン酸カルシウム沈澱法を用いて、この作成体を、DHFR cDNAを含有するpSV2-DHFRプラスミッドとともに、DHFR欠損CHO細胞中にトランسفエクションした。E13を逆方向に有する組換えpSVLベクターによるトランسفエクションを対照とした。リン酸緩衝化生理食塩水で予め透析した、胎児牛血清を含むスクレオチドを含まないMEMアルファ培地中での増殖により、DHFR遺伝子を発現する細胞を選択した。各クローニングを採取し、500nMメソトレキセートナトリウムの存在下での増殖によりトランسفエクションしたcDNAを増幅してさらに選択した。

#### 【0045】e) CHO細胞中での表面発現I型TNF-Rの検出

細胞(2.5×10<sup>5</sup>細胞/平板の濃度で15mm組織培養平板上に接種した)への放射標識ヒトTNFの結合を、すでに記載された方法(Holtermann and Wallach, 1987 J. Immunol. 149, pp. 1161-1167)で定量した。CHO細胞に対するTBP-Iのモノクローナル抗体の結合を試験するために、5mMEDTAを含有するリン酸緩衝化生理食塩水(PBS: 140mMNaCl, 1.5mMKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8mMNaHPO<sub>4</sub>, 2.7mKCl, 0.5mMgCl<sub>2</sub>, 0.9mCaCl<sub>2</sub>)中でインキュベートした後、0.5%牛血清アルブミンと15mMアジ化ナトリウムを含むPBS(PBS/BSA)中で50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の試験モノクローナル抗体と、0°Cで45分インキュベートすることにより分離した。PBS/BSAで細胞を洗浄した後、マウスI

g GのF (a b) 断片に対するアフィニティ精製したF I T C標識ヤギ抗体 (PBS/BSA中1:20) (Bio-Makor, Israel) で、0°Cでさらに30分間インキュベートし、次にBecton Dickinson蛍光活性化セルソーター440を用いて10<sup>4</sup>個の細胞の試料中の蛍光強度を測定して解析した。交差競合解析 (cross competition analysis) によりTBP-I分子中の4つの位置的に異なるエピトープを認識することが証明された(欧州特許出願No. 90115105.0) TBP-Iに対する3つのモノクローナル抗体 (クローン17、18、20) と、対照としてTNF- $\alpha$ に対するモノクローナル抗体 (すべて硫酸アノミウム沈殿により腹水から精製され、IgG2アイソタイプである) を使用した。

【0046】f) ELISAによる可溶性型のI型TNF-Rの定量

TBP-I特異的モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を使用して、サンドイッチ法の高感度酵素結合免疫吸着定量法を作成した。PBS中25 $\mu$ g/mlの抗体濃度の溶液とともに37°Cで2時間インキュベートすることにより、抗TBP-Iモノクローナル抗体クローン20(欧州特許出願No. 90115105.0)を96ウェル(well)のELISAプレート(maxisorp, Nunc, Denmark)に吸着させた。リン酸緩衝化生理食塩水、1%BSA、0.02%NaN<sub>3</sub>そして0.05%ツイーン20を含む溶液(ブロッキング溶液)で、37°Cでウェルをさらに2時間インキュベートして蛋白の非特異的吸着をブロックした後、試験試料を50 $\mu$ l/ウェルで適用した。次に、プレートを37°Cで2時間インキュベートした後、0.05%ツイーン20を加えたPBS(洗浄液)で3回洗浄し、ブロッキング溶液で1:500に希釈したTBP-Iに対するウサギ抗血清をウェルに加えた。4°Cでさらに12時間インキュベートした後、プレートを再び洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合精製ヤギ抗ウサギIgGで2時間インキュベートした。基質として2,2-アジノービス(3-エチルベンズチアゾリン-6スルホン酸) (Sigma) を用いて発色させた。600nmで酵素の生成物を比色定量した。精製TBP-Iを標準物質として用いた。

【0047】g) トランスフェクションしたCHO細胞の培地中での可溶性型I型TNF-Rの検出とその逆相HPLCによる解析

培地交換後48時間目に集めた、試験CHO細胞の培地の試料中の可溶性型I型TNF-Rの量を、上記の免疫測定法で定量した。逆相HPLCによる可溶性リセプターの解析のために、無血清培地(スクレオチドを含まないMEM $\alpha$ )中で48時間培養した。Amicon PM5膜による限外濾過により培地試料を100倍濃縮した

後、予め0.3%トリフルオロ酢酸水溶液で平衡化したAquaporin RP300カラム(4.5×30mm, Brownlee Labs)にかけた。非結合の蛋白がすべて除去されるまで0.5ml/分の速度で、この溶液でカラムを洗浄した後、前記(Engelman, H., et al., (1989) J. Biol. Chem. Vol. 264, p11974-11980)のように0.3%トリフルオロ酢酸水溶液中のアセトニトリルの濃度勾配で溶出した。0.5mlの画分を集め、真空中で濃縮した後、1MHEPES緩衝液ペブチドは9.0で中和した。画分中の可溶性I型TNF-Rの量をELISAで定量し、蛋白濃度はフルオレスカミン法により定量した。

【0048】例2

a) I型TNF-RのcDNAのクローニング

TNF結合蛋白TBP-Iとその関連蛋白TNFリセプターのcDNAをクローニングするために、TBP-IのNH<sub>2</sub>-末端アミノ酸配列に基づきデザインした3つの重複オリゴスクレオチドプローブ(図1A)を用いて数個のcDNAライブラリーをスクリーニングした。ヒト大腸のmRNAから得られるラムダGT11ライブラリー(ランダムにプライム(prime)されている、Clontech, Palo Alto, CA)中に、3つのプローブとハイブリダイゼーションする4つの組換えファージが検出された。これらの4つのファージの挿入体は同じ大きさであり、制限マッピングと配列解析により重複することが見いだされた。

【0049】この4つのうちで一番長いもの(図1BのC2、1989年6月2日にCollection Nationale De Cultures De Microorganismes (C.N.C.M.)、パリ、フランスに寄託された、寄託No. I-917)の配列の完全な解析から、全長に伸びたオープンリーディングフレーム(open reading frame)が明らかになった。このリーディングフレームにコードされているポリペプチド鎖は、TBP-IのNH<sub>2</sub>-末端アミノ酸配列に充分一致する。C2挿入体には開始コドンも停止コドンも見いだされなかった。C2に見いだされる配列(例1:操作法を参照)に対応する別のプローブを使用して再度大腸cDNAライブラリーを再スクリーニングすると、C2挿入体に重複する挿入体を含有する数個の他の組換えファージが得られた。しかしこれらのどれも5'又は3'方向へのcDNAに関して配列の情報を与えなかった。CEMリンパ球のmRNAから得られるラムダZAP cDNAライブラリー(オリゴdTで、ランダムにプライムされている、Clontech)の中に、このプローブとハイブリダイゼーションする5つのファージがあり、これらはC2より有意に長い挿入体を含有していた。

【0050】最も長い挿入体(E13、図1B)の配列

を完全に決定し(図1D)、5' と 3' 末端にそれぞれ翻訳されない 255 と 555 ヌクレオチドの領域に隣接して 1365 塩基対の長いオープンリーディングフレームの中に C2 配列(図1D のヌクレオチド 346-1277) を含むことが見いだされた。このヌクレオチド配列中の 256-258 位にある ATG 開始コドンと考えられる部位(図1D で星印で示してある)は、その上流にフレーム内停止コドンが 244-246 塩基にある。この開始位置は、翻訳開始コンセンサス配列(GGCCATGG、ヌクレオチド配列 253-259) の代替配列の可能性のある 1 つに一致する。

【0051】cDNA の 3' 末端の近くには特徴のあるポリ(A) 追加シグナルは存在しない。ヌクレオチド配列 2045-2050 の配列 ACTAAA は、このシグナルの代わりになるかも知れないが、効率は低いであろう。ヌクレオチド配列 1965-2000 に配列 G

(T)<sub>n</sub> (n は 4 から 8 の間で変化する) の 6 つの連続的繰り返しがある。

【0052】cDNA にコードされる蛋白の大きさ(約 50 キロダルトン)は、TBP-I より有意に大きい。この蛋白のアミノ酸配列(図1C) のハイドロパシー指数の計算から、2 つの主要な疎水性領域が明らかになった(図1D の角の丸い四角で囲った部分を参照)。NH<sub>2</sub>-末端にある 1 つはおそらくシグナルペプチドであり、切断部位はグリシンとイソロイシン(図1D でそれぞれ -1 と +1 で表示されている)の間であろう。191 と 213 残基の間に位置するもう 1 つの主要な疎水性領域は、膜のアンカリング領域(anchor region) に特徴的な数個の荷電アミノ酸が両端に隣接している。他の数種の絆膜蛋白のように、COOH-末端の疎水性領域を囲っているアミノ酸は塩基性である。絆膜領域は予想される蛋白を、ほとんど同じ大きさの細胞外と細胞内領域の 2 つに切断している。

【0053】細胞外領域は、アスパラギン結合グリコシル化の 3 つの推定部位を有している(図1D で上に線が引いてある)。細胞外領域のオリゴヌクレオチドの量が現在 TBP-I について報告されているもの(Seckinger, P., et al., (1989b) サイトカイン 1, Vol. 149 (要約)) と同じであると仮定すると、成熟蛋白の分子の大きさは、I 型リセプターについて推定されているもの(約 58 キロダルトン) に非常に近い(Hohmann, H. P., et al., (1989) J. Biol. Chem. Vol. 264, p 14927-14934)。

【0054】b) I 型 TNF-R の予想されるアミノ酸配列の特徴と TBP-I と TBP-II の構造の関係  
E13 cDNA でコードされる蛋白の細胞外領域のアミノ酸配列は、TBP-I で決められた数種のアミノ酸配列に充分一致する(表1)。それは、アミノ酸 20-32 に TBP-I の NH<sub>2</sub>-末端アミノ酸配列(図1D と

図1Aa を比較せよ)、アミノ酸 178-180 に TBP-I の COOH-末端に対応する配列: そしてまたコードされた蛋白のさらに下流に位置する最初のメチオニンに隣接して、TBP-I の臭化シアン切断断片の NH<sub>2</sub>-末端アミノ酸配列と同一の配列(図1D の破線)を含有する。また細胞外領域と TBP-I のアミノ酸組成に顕著な類似性がある(表2)。

【0055】このアミノ酸組成の最も目だつ特徴は、システイン残基の含量が非常に高いことである(図1D で四角で囲ってある)。細胞外領域内の他のアミノ酸とともにシステインの位置は、4 倍の繰り返しパターンを示す(図1D で下線で示してある)。TBP-I の COOH-末端配列に対応する TNF-R の細胞外領域内のアミノ酸配列(表1 と 図7 を参照)は、システインの多い繰り返し領域の COOH-末端に存在している。TBP-I の NH<sub>2</sub>-末端配列に対応する配列は、細胞外領域内のこの領域の NH<sub>2</sub>-末端のアミノ酸数個分上流に位置する配列に対応する(図1D の破線)。

【0056】TBP-I と I 型 TNF リセプターの間のアミノ酸配列の同一性に対して、可溶性型の II 型 TNF-R で調べた配列(TBP-II, 表1)は、I 型 TNF-R のどの配列にも対応しなかった。2 つのリセプターの間に免疫学的交差反応性が欠如していることから、これは予想されることであった(Engelman, H., et al., (1990) J. Biol. Chem. Vol. 265, p 1531-1536)。

【0057】I 型 TNF-R の推定される細胞外領域のシステイン残基の含量が非常に高いのに対して、細胞内領域にはシステイン残基は 5 つしかない。絆膜領域に近い 2 つ(227 と 283 位)の間には、プロリン残基が多く(残基の 15%)、セリンとスレオニンがもっと多く(36%)、その大部分はお互いに非常に接近して又は隣接して存在している、55 個のアミノ酸が伸びている。

#### 【0058】例3

##### I 型 TNF-R cDNA の発現

E13 cDNA そしてさらに TBP-I にコードされる蛋白の関係を探るために、この蛋白を CHO 細胞中で発現させた。E13 cDNA を発現ベクター中に導入し、ジヒドロフォレートリダクターゼ(DHFR) cDNA を含有する組換えベクターで DHFR 欠損細胞中にコトランスフェクションした。ヌクレオチドを含まない培地中で増殖させて選択した後、各クローンをメソトレキセート存在下で増殖させて増幅した。TBP-I の位置的に異なるエピトープに結合する数個のモノクローナル抗体と反応するいくつかのクローンが検出された(図2)。蛋白の発現は、ヒト TNF の細胞への特異的結合の増加に相關した(表3)。

【0059】この蛋白に対するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を使用した高感度の免疫測定法(操作

法、例1f)を適用して、その表面にヒトTNF-Rを発現するCHO細胞の培地中に、また可溶性型の蛋白が検出された(表3)。TNF-Rを発現した5つの異なるCHOクローンのすべてがこの可溶性蛋白を産生した。この細胞表面リセプターを発現しない他のいくつかのトランسفエクションされたクローンは、その可溶性型も産生しなかった。逆相HPLCで解析すると、CHO酸性可溶性TNF-Rは単一のピークとして溶出し、保持時間はTBP-Iと同じであった(図3)。

**【0060】例4**

TBP-IをコードするcDNAのクローニングとチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞中でのTBP-Iの発現

哺乳動物細胞中でのI型ヒトTNFレセプターの可溶性領域をコードするDNAの効率的な発現に適したプラスミッドを得るため、図1Dで示した256-858の位置のDNA配列を発現ベクター中にクローニングした: 1つのプラスミッドでは遺伝子発現はSV40初期遺伝子下にあり; 2つ目のプラスミッドでは遺伝子発現はサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターの制御下にある。これらのベクターはCaPO4沈澱法により、プラ

スミッドDHF選択遺伝子マーカーとともにCHO細胞に導入された。

**【0061】発現ベクターの作成**

1) SV40初期プロモーター-TBP-I融合: プラスミッドpSV-TBP

TBP-Iの構成的発現は、強いSV40初期プロモーターに融合したTBP-IをコードするDNA配列を含有する発現ベクターを用いることにより、可能である(図5)。

**【0062】段階1: TBP-IをコードするDNA断片** (そのシグナルペプチドを含み、アミノ酸180に伸びている)をPCR增幅法により調製した。增幅のために2つのオリゴヌクレオチドをプライマーとして使用した: 5'末端プライマーは、シグナルペプチドの最初の7つのアミノ酸をコードする配列を含み、その前に6つのヌクレオチドがある; 3'末端オリゴヌクレオチドは、アミノ酸残基174から180までをコードする配列を含有し、その後に2つの停止コドンがある(TGAとTAA)。

**【0063】PCR增幅の条件は以下の通りである。**

	温度 °C	時間 分
1サイクル	94	6
	50	2
	72	4
30サイクル	94	1
	50	2
	72	4
1サイクル	94	1
	50	2
	72	12

**【0064】段階2:** 配列を証明した後、増幅したDNA断片を、プラント末端結合法により、プラスミッドpGEM-1のHincII制限部位にクローニングした。プラスミッドpTBP-16とpTBP-17はこうして得られた2つのプラスミッドであり、クローニン

グベクターに関してTBP-I挿入体の配向が異なる。

**【0065】段階3:** 2つの隣接制限部位HindII (5'末端)とBamHI (3'末端)を使用して、プラスミッドpTBP-17からTBP-Iを含むDNA断片を切り出した。

【0066】段階4：最後にこの断片を、発現ベクター-pSV-E3のHindIIIとBclI制限部位の間にクローニングした。

【0067】得られるプラスミッドをpSV-TBPと呼ぶ(図5)。

【0068】2) CMVプロモーター-TBP-I融合：プラスミッドpSV-TBP

別の方法では、TBP-Iの構成的発現は、CMVプロモーターに融合されたTBP-IをコードするDNA配列を含有する発現ベクターを使用して行われる(図6)。

【0069】CMVに基づくベクターの作成の最初の2つの段階は、上記のSV40-TBP-I融合プラスミッドの作成について記載したものと同じである。

【0070】段階3：2つの隣接制限部位HindIII(5'末端)とXbaI(3'末端)を使用して、プラスミッドpTBP-17からTBP-Iを含むDNA断片を切り出した。

【0071】段階4：最後にこの断片を、発現ベクター-Rc/CMVのHindIIIとXbaI制限部位の間にクローニングした。

【0072】こうして得られるプラスミッドをpCMV-TBPと呼ぶ。

【0073】CHO細胞中でのヒトTBP-Iの発現  
DHFR活性の欠如したCHO細胞CHO-K1DHFR-を、切断されていないpSV-TBPDNA(73μg)とmpSV2DHFR(6μg)の12:1混合物とともに、CaPO4共沈澱法により形質転換させた。後者は選択マーカーである。あるいはCHO細胞をpCMV-TBP(30μg)とmpSV2DHFR(6μg)の5:1混合物で形質転換させた。

【0074】10%の胎児牛血清(FCS)を含む栄養混合物F12(Gibco)中で、5%CO<sub>2</sub>で37°Cで細胞を増殖させた。DNAトランスフェクションのために、5×10個の細胞を9cmのプレート中で1日培養した。0.45mlのトリス-塩酸pH7.9、0.1mM EDTAに溶解したプラスミッドDNAを0.05mlの2.5M CaCl<sub>2</sub>と混合して、CaPO<sub>4</sub>-DNA共沈澱物を調製した；次に0.5mlの280mMNa<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、50mMHepes緩衝液pH7.1を、静かに攪拌しながら加えた。沈澱を形成させるため、混合物を室温で30-40分間放置した。CaPO<sub>4</sub>-DNAを細胞に添加して、細胞を室温に30分間放置して、9mlの栄養混合物F12、10%FCSを加え、培養物を4時間CO<sub>2</sub>インキュベーターに戻した。培地を除去し、F12中10%のグリセロールで浸

透圧ショックを与えた。非選択培地中で48時間増殖の後、細胞をトリプシン分解し、選択培地(DMEM)(H21, Gibco)150μg/mlプロリン、そして10%FCSから成り、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で充分透析してある)中にサブ培養(subculture)した。ある場合には、ヌクレオチドのないMEMアルファ培地(F20, Gibco)を使用した。培養物を37°Cに維持し、3-4日毎に10%CO<sub>2</sub>と培地を交換した。約15日後にクローニングを単離し、トリプシン分解し、増殖させて大量培養した。

【0075】チミジンが欠如した培地(透析血清を含むDMEM)中で増殖する形質転換体を得た。例1fに記載した酵素結合免疫定量法により、分泌された蛋白の濃度を測定して、各形質転換クローニングの培養上澄液又は混合物集団の培養上澄液をTBP-Iについてスクリーニングした。混合物細胞集団の培養上澄液に10ng/ml迄の濃度のTBP-Iが検出された。

【0076】この例は、I型TNFリセプターの可溶性領域をコードするDNAで、哺乳動物細胞をトランスフェクションすることにより、TBP-I又は類似の可溶性蛋白が得られることを示している。

【0077】例5

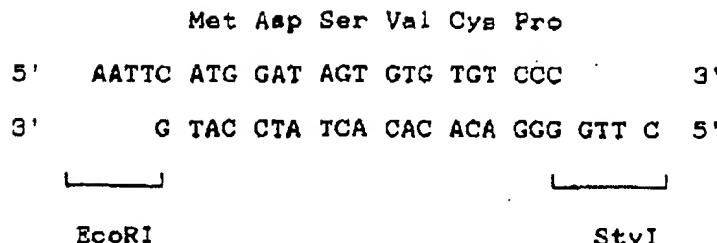
大腸菌でのTBP-Iの発現

大腸菌でのTBP-Iの発現のために、シグナルペプチドと最初の19個のアミノ酸(Arg)をコードする配列を除去しなければならない。さらにAsp残基の前にはMet残基がなければならない。次に好適な断片を、ハイブリッドtryptylacプロモーターを含む発現ベクターpKK223-3中にクローニングした。この目的の達成のために、プラスミッドpTBP-16(図5)を、2つのユニークな制限部位StyIとHindIIIで切断した。StyI制限部位は、C/CAA GGであり、従ってこれはPro24のあとで切断される。HindIII制限部位はプラスミッドのポリリンカー中に位置し、Asn180に続く2つの添加した停止コドンの下流にある(図5)。

【0078】TBP-Iをコードする得られるDNA断片は、無傷の3'末端と先端を切った(truncated)5'末端(StyI部位に先行する配列をAsp-Ser-Val-Cys-Proをコードする配列が除去されている)を有する。

【0079】StyI-HindIII断片の発現ベクターpKK223-3へのクローニングのために、以下の合成オリゴヌクレオチドを使用した：

【化1】



【0080】この2本鎖オリゴヌクレオチドの1つの端はEcoRI制限部位である。この末端は、tryptophanプロモーターの下流に位置するプラスミッドpKK223-3のEcoRI部位に結合されている。この2本鎖オリゴヌクレオチドの2つ目の端は、TBP-IDNA断片のStyIに結合したStyI制限部位である。

【0081】残りの配列は、最初の5つのアミノ酸をコードするコドンは復元され、Asp20の前に追加のMetコドンが加えられているようなものである。EcoRIとHindIIIで消化したプラスミッドpKK223-3を、2本鎖合成オリゴヌクレオチドとStyI-HindIII TBP-I断片に結合することにより、発現ベクターが得られる。

【0082】TBP-Iを得るために、大腸菌細胞をこの発現ベクターでトランスフェクションする。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1はI型TNFリセプターcDNAのヌクレオチド配列と、コードされた蛋白の予想されるアミノ酸

配列を示す。

【図2】図2は、E13cDNAでトランスフェクションされたCHO細胞中での、TBP-Iに対するモノクローナル抗体を使用しての、I型TNF-Rの検出を示す。

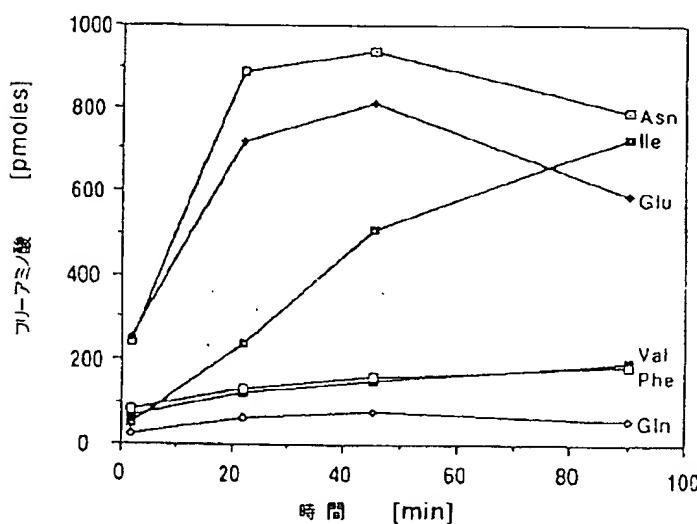
【図3】図3は、I型TNF-RのCHO-産生、可溶性型の逆相HPLCを示す。

【図4】図4は、カルボキシペプチダーゼYによるTBP-IのCOOH-末端のアミノ酸の放出の経時変化を示す。

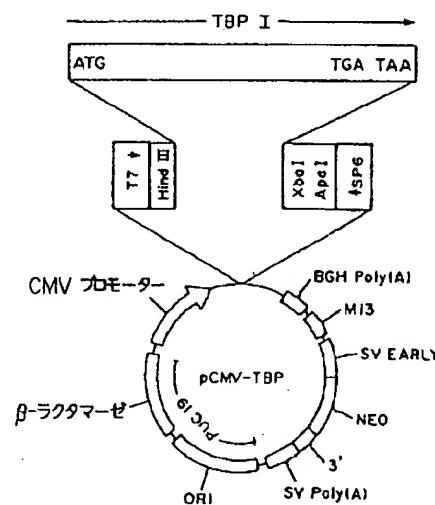
【図5】図5は、プラスミッドpSV-TBPの作成を示し、これは強いSV40初期遺伝子プロモーター(strong SV40 early gene promoter)と融合した、TBP-IをコードするDNA配列を有する。

【図6】図6は、プラスミッドpCMV-TBPの作成を示し、これはサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターと融合した、TBP-IをコードするDNA配列を有する。

【図4】



【図6D】



【図1A】

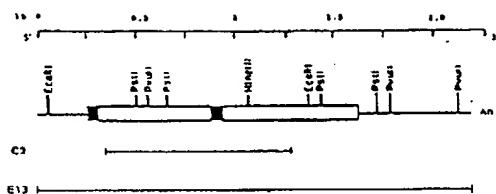
A a Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln

b GGI GTC GCG TGC ATA TAA GCA CGG CT  
T T G G G  
.

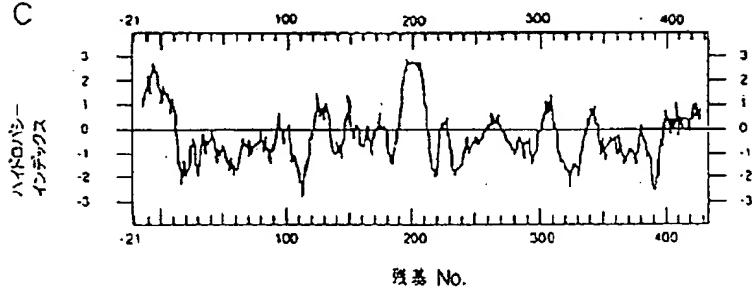
CCA CTC CCA TTC ATA TA  
C T C T G  
G T

d                   TTC ATA TAA CTA CGA CT  
                  T G C G C  
                  A C T

8



8



【図1B】

D

18 ACCCCAAAGCCAGAGCTGGAGGCTCACTCCAGAGATTCTGAGAAAATTAAACCAACAGGGGCAAGAGTCAGTGACCCAGGCTCTATGCCAGTCCTAAACCTCAA 136  
 137 CTGTCACCCCCAGCCACTGGAGCTCTGGACAGACCCACTCCCCAGCCACTGGGCTCCACACTGGCCAGCTGGCCAAATGGGGAGTGAGAGCCATACCTCTGGC 235

-23 -18 -1 -11

met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu

256 ATC CGC CTC TCC ACC GTG CCT GAC CTG CTG CTG CCC CTG CGA ATA TAC CCC TCA CGG GTT ATT CCA CTG 345

\* 10 20 30

Val Pro His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Pro Glu Gly Lys Tyr Ile His Pro Glu Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr

346 GTC CCT CAC CTA CGG GAC AGC GAG AAC AGA GAT AGT GTG TCT CCC CAA CGA AAA TAT ATC CAC CCT CAA ATT ATT TCC ATT TCC TGT ACC 435

\* 40 50 60

Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Cys Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Thr

436 AAG TCC CAC AAA CGA ACC TAC TTG TAC ATT CAC TGT CCA CGC CCC CGC CAG CAT AGC GAC GAC TCC ACC AGC GAC TCC TCC TCC ACC 525

70 80 90

Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Cys Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp

526 CCT TCA CGA AAC CAC CTC AGA CAC TCC CCT ACC TCC TCC AAA TCC CGA AAC CGA ATC CCT CAC CGC GAC ATC CCT TCT TCT TCC ACA CCT GAC 615

-100 -110 -120

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Glu Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu

616 CGG GAC ACC GTG TGT GGC TGC ACC AAC TAC CCG CAT TAT TCC ACT CGA AAC CCT TCC CAG TCC ATT TCC AGC CTC TCC 705

130 140 150

Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Glu Glu Lys Glu Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val

706 ATT CGG ACC CTC GAC CTC TCC TCC TCC TCC AAC AAC AAC AAC CTC TCC ACC TCC CAT GCA CGT TTC TTT CTA AGA CGA AAC GAG TGT CTC 795

160 170 180

Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Ile Cys Leu Pro Glu Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr

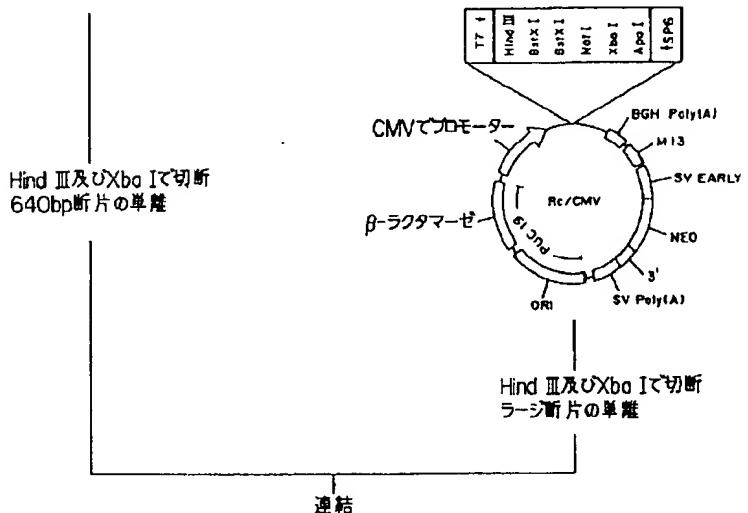
796 TCC TGT AGT AAC TGT AAC AAA AGC CTC GAG AAC AAC TGC TCC CCC CAC ATT GAG ATT CCT AAC GGC ACT GAC GAC TCA CGC ACC 885

190 200 210

Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Cys Leu Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Glu Arg Trp Lys

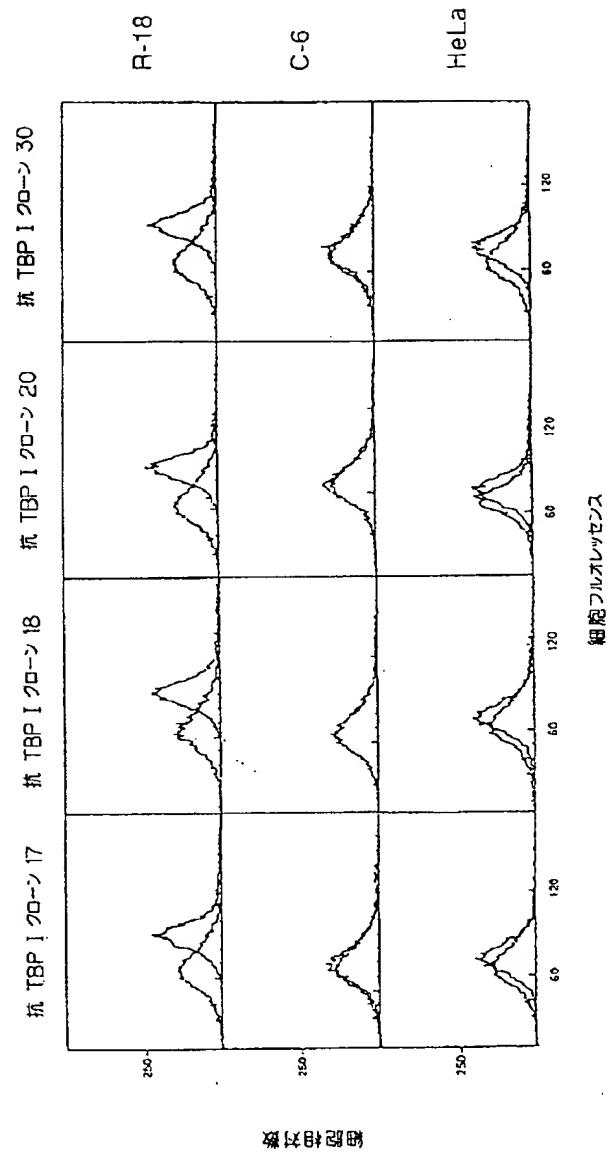
886 ACA GTC CTG TGT CCC CTC GTC ATT TCC TTT CGT CTC ATT TCC CTC ATT CCT TTA TCC CTC ATT CCT TTA ATC ATT CGC TAC CAA CGG TCC AAC 975

【図6C】

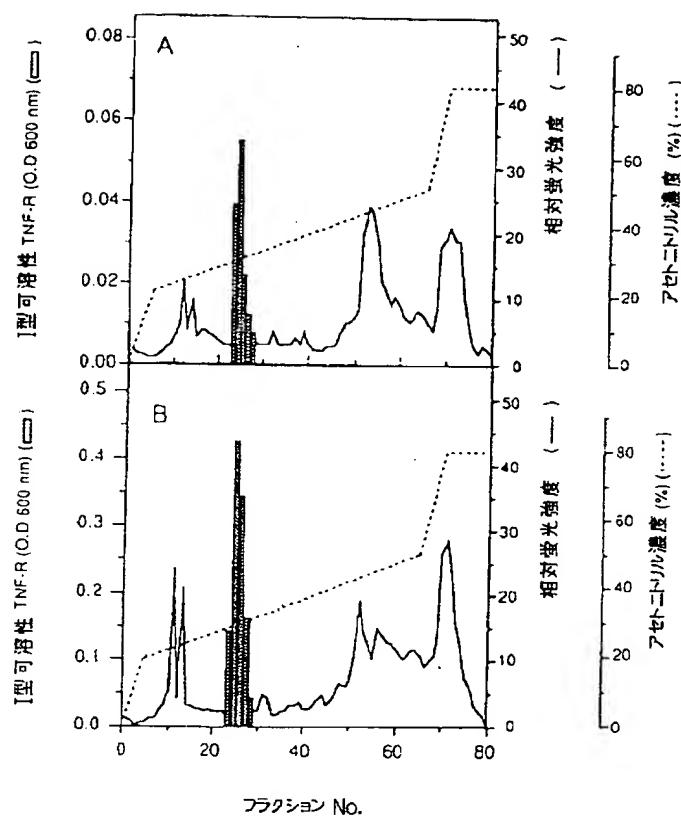




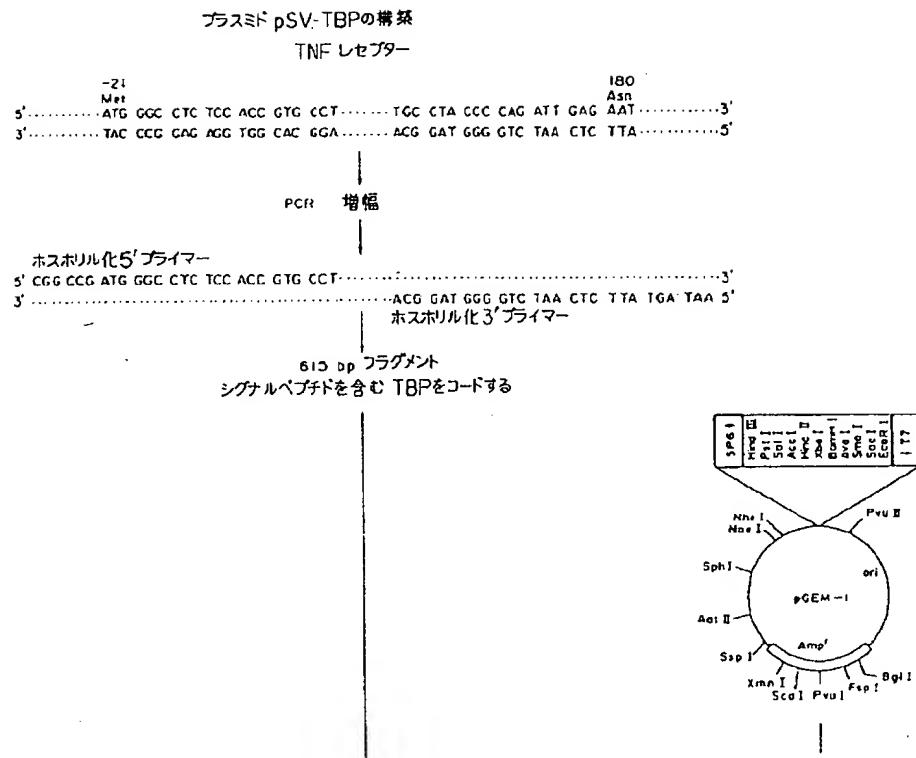
【図2】



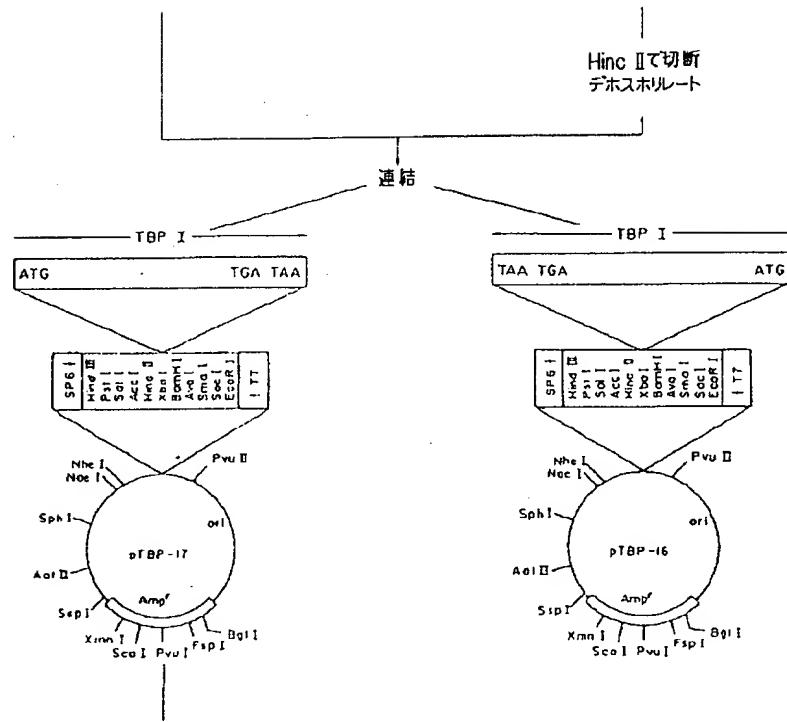
【図3】



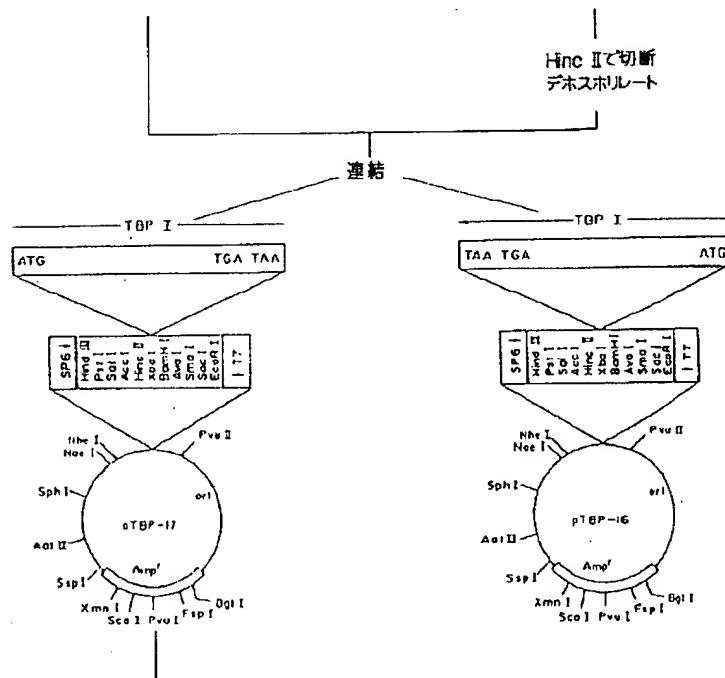
【図5A】



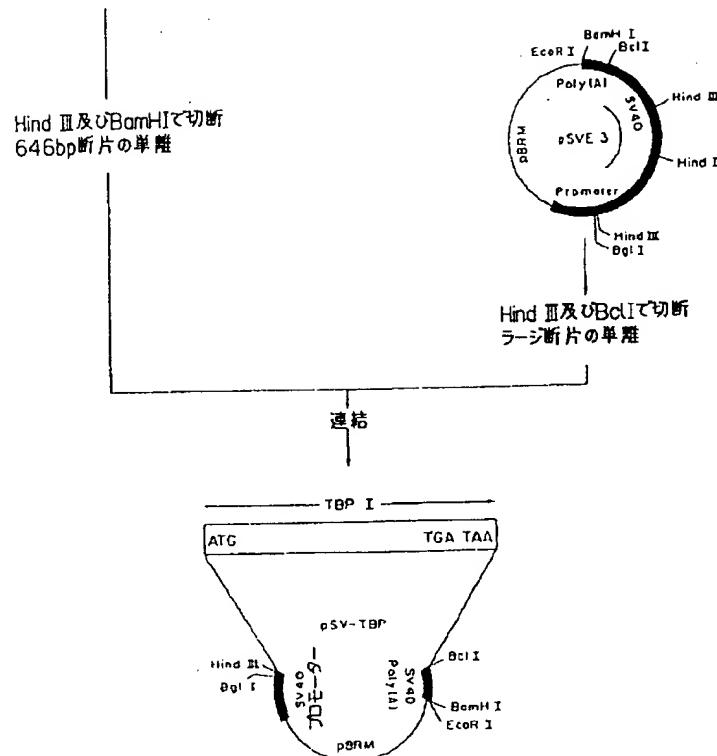
【図5B】



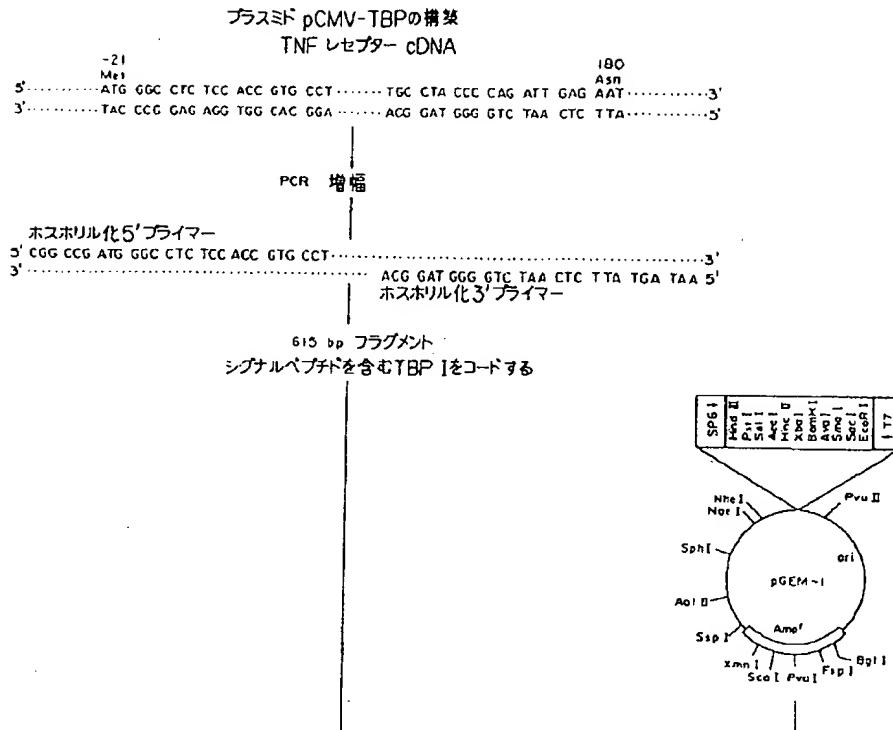
【図6B】



【図5C】



【図6A】



## 【手続補正書】

【提出日】平成4年1月30日

## 【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

## 【図面の簡単な説明】

【図1A】I型TNFリセプターcDNAのスクレオチド配列と、コードされた蛋白の予想されるアミノ酸配列を示す。

【図1B】I型TNFリセプターcDNAのスクレオチド配列と、コードされた蛋白の予想されるアミノ酸配列を示す。

【図1C】I型TNFリセプターcDNAのスクレオチド配列と、コードされた蛋白の予想されるアミノ酸配列を示す。

【図1D】I型TNFリセプターcDNAのスクレオチド配列と、コードされた蛋白の予想されるアミノ酸配列を示す。

【図2】E13 cDNAでトランスフェクションされた

CHO細胞中での、TBP-Iに対するモノクローナル抗体を使用して、I型TNF-Rの検出を示す。

【図3】I型TNF-RのCHO-産生、可溶性型の逆相HPLCを示す。

【図4】カルボキシペプチダーゼYによるTBP-IのCOOH-末端のアミノ酸の放出の経時変化を示す。

【図5A】プラスミドpSV-TBPの作成を示し、これは強いSV40初期遺伝子プロモーター (strong SV40 early gene promoter) と融合した、TBP-IをコードするDNA配列を有する。

【図5B】プラスミドpSV-TBPの作成を示し、これは強いSV40初期遺伝子プロモーター (strong SV40 early gene promoter) と融合した、TBP-IをコードするDNA配列を有する。

【図5C】プラスミドpSV-TBPの作成を示し、これは強いSV40初期遺伝子プロモーター (strong SV40 early gene promoter) と融合した、TBP-IをコードするDNA配列を有する。

を有する。

【図6 A】プラスミッドp CMV-TBPの作成を示し、これはサイトメガロウィルス(CMV)プロモーターと融合した、TBP-IをコードするDNA配列を有する。

【図6 B】プラスミッドp CMV-TBPの作成を示し、これはサイトメガロウィルス(CMV)プロモーターと融合した、TBP-IをコードするDNA配列を有する。

【図6 C】プラスミッドp CMV-TBPの作成を示し、これはサイトメガロウィルス(CMV)プロモーターと融合した、TBP-IをコードするDNA配列を有する。

【図6 D】プラスミッドp CMV-TBPの作成を示し、これはサイトメガロウィルス(CMV)プロモーターと融合した、TBP-IをコードするDNA配列を有する。

---

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5	識別記号	府内整理番号	F 1	技術表示箇所
C 12 R 1:91)				
(C 12 P 21/02				
C 12 R 1:19)				
(72) 発明者 オリバー ケムパー			(72) 発明者 コルト ブラケブスク	
ドイツ連邦共和国 ボツケンハイム, アネ			ドイツ連邦共和国 ブラウンスクヴァイ	
モネン ベグ 10			グ, ザルツバルメル ベグ 9	
(72) 発明者 ハルトムツト エンゲルマン			(72) 発明者 ダン アデルカ	
ドイツ連邦共和国 ミュンヘン, ヨゼフ-			イスラエル国 ホロン, アビビム ストリ	
ルツツーベグ 35			ート 4	